

**Untersuchungen
zur Bakteriensymbiose der Trypetiden
(Diptera)**

**Inauguraldissertation
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen**

zur

Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von

Johanna Hellmuth
aus Regensburg

Berlin-Göttingen-Heidelberg

Springer-Verlag

1956

1956 №72

Als Dissertation genehmigt
von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Erlangen

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Februar 1956

Dekan: Universitätsprofessor Dr. Schneider

Berichterstatter: Universitätsprofessor Dr. Stammer

Berichterstatter: Universitätsprofessor Dr. Neuhaus

Sonderdruck aus: Zeitschrift für Morphologie und Ökologie der Tiere
44. Band, Heft 6



Aus dem Zoologischen Institut der Universität Erlangen

UNTERSUCHUNGEN ZUR BAKTERIENSYMBIOSE DER TRYPETIDEN (DIPTERA) ***

Von

HANNA HELLMUTH

(Eingegangen am 5. Dezember 1955)

Inhalt

	Seite
Einführung	483
Material und Methode	484
1. Die untersuchten Arten	484
2. Sammeln und Behandeln der Tiere	485
3. Bakteriologische Technik	486
Beiträge zur Morphologie der Trypetidensymbiose	489
Bakteriologische Untersuchungen	491
1. Die Symbionten der Subfamilie Trypetinae und Tephritinae	491
2. Die Symbionten der Subfamilie Dacinae	500
3. Die Begleitkeime	506
Hinweise auf die Bedeutung der Symbiose	507
Zusammenfassung	515
Literatur	516

Einführung

Über die Bakteriensymbiose der Trypetiden liegt als einzige eine umfassende Arbeit von H. J. STAMMER aus dem Jahre 1929 vor, die an die Untersuchungen von L. PETRI über symbiontische Einrichtungen der *Dacus oleae* GMELIN aus den Jahren 1904—1910 anknüpft. PETRI beschrieb bereits damals die Blindsäcke dieser Larve am Beginn des Mitteldarmes unterhalb des Proventriculus als Wohnstätte des Symbionten, ebenso das Kopfglied der Imago und ihre Beschmiereinrichtungen, die der Übertragung der Bakterien auf die Nachkommen dienen. STAMMER konnte die Richtigkeit dieser Ergebnisse bestätigen und gleichzeitig die allgemeine Verbreitung einer Bakteriensymbiose bei der ganzen Familie der Trypetiden feststellen, da sich seine ausgedehnten Untersuchungen auf insgesamt 37 Arten erstreckten, die zu den drei Subfamilien der Dacinae, Trypetinae und Tephritinae gehören. Dabei

* Herrn Professor Dr. PAUL BUCHNER in Verehrung gewidmet.

** Für die Anregung zu diesem Thema und für wertvolle Hinweise möchte ich Herrn Prof. Dr. H. J. STAMMER meinen herzlichsten Dank aussprechen. Die bakteriologischen Untersuchungen wurden am Hygienischen Institut des Städtischen Krankenhauses Nürnberg durchgeführt. Mein besonderer Dank gilt Herrn Oberarzt Dr. KELLNER, der mir in allen auftretenden bakteriologischen und technischen Fragen jederzeit zur Seite stand.

zeigte sich, daß in der Ausbildung der symbiontischen Einrichtungen eine Höherentwicklung stattgefunden hat, die von den Trypetinen über die Tephritinen zu den Dacinen führt.

PETRI war es nicht gelungen, das von ihm als Symbionten bezeichnete *Bacterium savastanoi* SMITH auf direktem Wege zu kultivieren. Auch in der Folge führten, wie mir Herr Direktor C. SIBILIA der R. Stazione di Patologia vegetale, Roma, in einer Mitteilung bestätigte, weitere diesbezügliche Versuche zu keinem Erfolg. Da sich auch STAMMERs Arbeiten ausschließlich mit der Morphologie der Symbiose befaßten, soll es Aufgabe der vorliegenden Untersuchungen sein, die Kultivierung und systematische Einordnung der symbiontischen Bakterien der Familie Trypetidae durchzuführen.

Material und Methode

1. Die untersuchten Arten

Die Angehörigen der Familie der Trypetiden sind sämtlich Pflanzenparasiten, und zwar leben sie in Infloreszenzen der Kompositen, als Stengel- und Blattminierer, zum Teil aber auch in Früchten.

Das Material, das ich für meine Untersuchungen verwendete, sammelte ich zum größten Teil selbst, und zwar in den Sommermonaten 1954 und 1955. Es stammte aus Mittelfranken (hauptsächlich aus der Umgebung von Nürnberg), aus der Oberpfalz (hauptsächlich aus der Umgebung von Weiden), aus der Gegend von Bayrischzell und Garmisch-Partenkirchen. Larven und Imagines von *Dacus oleae* erhielt ich durch die freundliche Vermittlung des Herrn Prof. STAMMER von Herrn Prof. P. BUCHNER, Porto d'Ischia (Napoli), dem ich dafür an dieser Stelle herzlich danken möchte. Es war mir so möglich, sowohl Vertreter jeder der drei Subfamilien und der ihnen angehörenden Tribus, soweit sie in Deutschland vorkommen, als auch der in verschiedenen Pflanzen und Pflanzenteilen lebenden Arten zu untersuchen.

Um über das verarbeitete Material einen Überblick zu gewinnen, führe ich die behandelten Arten der untersuchten Tiere in systematischer Anordnung im folgenden an. Die erste angegebene Ziffer bedeutet die Anzahl der Larven, die zweite die der Puppen, die dritte die der Imagines.

Tabelle 1

Subfamilie: Dacinae

Tribus Dacini

1. <i>Dacus oleae</i> GMELIN	<i>Olea europaea</i>	10—2— 7
------------------------------	----------------------	---------

Subfamilie: Trypetinae

Tribus Euribiini

2. <i>Euribia cardui</i> L.	<i>Cirsium arvense</i>	12—3— 7
3. <i>Euribia cuspidata</i> MEIG.	<i>Centaurea iacea</i>	8—0— 9
4. <i>Euribia eriolepidis</i> L.	<i>Echinops ritro</i>	8—0— 8
5. <i>Euribia quadrifasciata</i> M.	<i>Centaurea cyanus</i>	0—0— 3

Tribus Trypetini

6. <i>Ceratitis capitata</i> WIED.	<i>Citrus</i> -Arten	15—0— 3
7. <i>Platyparea poeciloptera</i> S.	<i>Asparagus officinalis</i>	30—6—20

8. <i>Vidalia cornuta</i> SCOP.	<i>Eupatorium cannabinum</i>	0—0—10
9. <i>Rhagoletis cerasi</i> LOEW.	<i>Prunus cerasus</i>	55—7—0
10. <i>Rhagoletis alternata</i> FALL.	<i>Rosa canina</i>	29—8—63
11. <i>Rhagoletis meigeni</i> LOEW.	<i>Berberis vulgaris</i>	0—0—22
12. <i>Trypeta artemisiae</i> FABR.	<i>Artemisia vulgaris</i>	8—0—12
13. <i>Phagocarpus permundus</i> HARR.	<i>Crataegus oxyacanthae</i>	38—0—0
14. <i>Acidia cognata</i> WIED.	<i>Tussilago farfara</i>	5—2—0
15. <i>Myiolia lucida</i> FALL.	<i>Lonicera xylosteum</i>	24—5—0

Subfamilie: Tephritinae

Tribus Terellini

16. <i>Ceriocera ceratocera</i> HEND.	<i>Centaurea scabiosa</i>	4—0—0
17. <i>Chaetorellia iaceae</i> R.-D.	<i>Centaurea montana</i>	22—6—34
18. <i>Chaetostomella onotrophes</i>	<i>Centaurea</i> -, <i>Cirsium</i> -Arten	44—3—25
19. <i>Terellia serratulae</i> L.	<i>Carduus nutans</i>	13—0—2
20. <i>Orellia ruficauda</i> FABR.	<i>Cirsium arvense</i>	10—0—0
21. <i>Orellia colon</i> MEIG.	<i>Centaurea cyanus</i>	0—0—1
22. <i>Orellia winthemi</i> MEIG.	<i>Cirsium palustre</i>	4—0—0
23. <i>Orellia tussilaginis</i> FABR.	<i>Centaurea iacea</i>	3—0—0

Tribus Xyphosiini

24. <i>Xyphosia miliaria</i> SCHR.	<i>Cirsium arvense</i>	15—0—4
25. <i>Icterica westermanni</i> MEIG.	<i>Senecio</i> -Arten	47—0—0
26. <i>Icterica zelleri</i> LOEW.	<i>Senecio alpinus</i>	21—0—0

Tribus Tephritini

27. <i>Paroxyna absinthii</i> FABR.	<i>Bidens cernua</i>	0—0—2
28. <i>Sphenella marginata</i> FALL.	<i>Senecio</i> -Arten	11—0—9
29. <i>Ensina sonchi</i> L.	<i>Senecio</i> -Arten	8—2—17
30. <i>Euaesta guttata</i> FALL.	<i>Cirsium palustre</i>	16—0—2
31. <i>Tephritis angustipennis</i> L.	<i>Achillea ptarmica</i>	0—2—6
32. <i>Tephritis arnicae</i> L.	<i>Arnica montana</i>	34—22—34
33. <i>Tephritis bardanae</i> SCHR.	<i>Arctium lappa</i>	16—0—63
34. <i>Tephritis cometa</i> L.	<i>Cirsium arvense</i>	11—0—18
35. <i>Tephritis conura</i> L.	<i>Cirsium oleraceum</i>	16—8—43
36. <i>Tephritis dilacerata</i> L.	<i>Sonchus arvensis</i>	4—7—71
37. <i>Tephritis nigricauda</i> L.	<i>Matricaria chamomilla</i>	1—0—2
38. <i>Tephritis truncata</i> L.	<i>Arnica montana</i>	0—0—10
39. <i>Tephritis nessii</i> WIED.	<i>Chrysanthemum leuc.</i>	6—4—12
40. <i>Trypanea amoena</i> FRFLD.	<i>Lactuca saligna</i>	2—0—0
41. <i>Trypanea stellata</i> FUESS.	<i>Senecio vulgaris</i>	18—2—21
42. <i>Acanthiophilus helianthi</i> R.	<i>Centaurea nigra</i>	13—0—0

Tribus Ditrichini

43. <i>Noeeta pupillata</i> FALL.	<i>Hieracium murorum</i>	37—0—11
-----------------------------------	--------------------------	---------

2. Sammeln und Behandeln der Tiere

Der weitaus größte Teil des Materials wurde als Larven aus den Blütenköpfen, von Stengeln, Früchten und Blättern gesammelt. Dabei wurde, soweit möglich, versucht, die gleiche Art aus verschiedenen Pflanzenarten zu erhalten. Nur ein ganz geringer Teil der Fliegen wurde durch Keschern gewonnen. Somit stammten die Fliegen meist aus eigener Aufzucht. Denn es erschien mir am zweckmäßigsten, die verpuppungsreifen Larven aus ihrer Umgebung herauszunehmen und sie nach

besonderer Aufbereitung in Schalen verpuppen und steril schlüpfen zu lassen. In wenigen Fällen verbrachte ich als Vergleichsmaterial die Blütenköpfe in Gläser und wartete dort das Schlüpfen der Tiere ab. Es zeigte sich jedoch, daß die Imagines, die mit verschiedenen faulenden Substanzen in Berührung kommen, ein verändertes Bild ihrer Darmflora aufweisen. Ich werde an anderer Stelle darauf noch näher eingehen. Das Schlüpfen der Imagines erfolgte zum Teil in wenigen Wochen, bei manchen Arten jedoch erst im nächsten Frühjahr. Obgleich die Zuchtschalen in geheizten Räumen untergebracht waren, verkürzte sich die Zeit des Puppenstadiums nur um wenige Wochen. Ein Verbringen in den Eisschrank mit anschließender Erwärmung konnte die Entwicklungsdauer nicht verkürzen. Es scheint also, daß in diesem Falle die Kälte allein nicht die entscheidende Rolle in der Entwicklungsenthemmung spielt.

Trotz Fütterung und bester Lebensbedingungen gelang es mit Ausnahme von *Platyparea poeciloptera* und *Rhagoletis alternata* nicht, die Fliegen zur Eiablage zu bringen. Die Untersuchung mußte sich deshalb in den übrigen Fällen auf steril präparierte Eier aus den Ovarien legefähiger Weibchen beschränken.

Der Befall der Infloreszenzen war bei den einzelnen Arten sehr verschieden groß, und so glückte es in manchen Fällen nicht, eine größere Anzahl von Individuen zu gewinnen. Vor allem die Beschaffung der Blattminierer bereitete große Schwierigkeiten, und erst im zweiten Jahr gelang es diese Arten, vor allem in den über 900 m hoch gelegenen Gebirgsregionen, aufzufinden. Allerdings zeigten hier Blätter verschiedener Pflanzenfamilien Befall durch die gleiche Blattminiererart.

3. Bakteriologische Technik

Das eingebrachte Material wurde sobald als möglich verarbeitet. Durch vorsichtiges Öffnen der Blütenköpfe, Stengel und Früchte wurden die Larven unbeschädigt herauspräpariert. Wie bereits erwähnt, wurde ein größerer Teil der Larven jeweils zur Weiterentwicklung verwendet, da häufig eine Parasitierung der Larven die Zuchtergebnisse beeinträchtigte.

Unter Verwendung steriler Instrumente wurden die für die Aufzucht bestimmten erwachsenen Larven zunächst in sterile Petrischalen verbracht und die Verpuppung abgewartet. Diese erfolgt manchmal in wenigen Stunden, meist aber in einem Tage. Denn die Entnahme aus der gewohnten Umgebung entzieht die Feuchtigkeit, was sehr schnell die Verpuppung auslöst und das Abscheiden der Tönnchencuticula herbeiführt. Andererseits kann man durch Zugabe feuchter Watte, in die sich die Larven in kürzester Zeit zurückziehen, die Verpuppung um einige Tage verzögern. Anschließend wurden die Tönnchen in 5% Tegolösung¹ 10 min lang gebadet, in steriler physiologischer Kochsalzlösung mehrere Male abgespült und in sterilen Petrischalen aufbewahrt. An Stelle von Tegolösung zur Desinfektion wurde zunächst auch 0,25% Formalin- bzw. Quartaminlösung verwendet. Es zeigte sich, daß die Sterilisation mit Tegolösung vollkommen unschädlich war, während durch die Formalin- und Quartaminlösung in einigen Fällen Mißgeburten auftraten und einige der Tönnchen überhaupt keine Imagines ergaben. Deshalb wurde das gesamte weitere Aufzuchtmaterial mit Tegolösung sterilisiert. Daß die Außenhülle der Tönnchen dadurch vollkommen keimfrei wurde, bewiesen die immer wieder angestellten Wachstumsversuche im Spezialnährboden, die sämtlich negativ verliefen.

Da die Tönnchen nicht zu trocken, aber auch nicht zu feucht aufbewahrt werden dürfen, gab ich zu jeder Petrischale sterile mit sterilem Aqua. dest. getränkte

¹ Tego 103 G: Antibakterieller Wirkstoff: DL-(Oktylaminoäthyl)-Glycin. Th. Goldschmidt A.-G., Essen.

Watte um die nötige Feuchtigkeit zuzuführen. Um ein Austrocknen und ein dadurch notwendig werdendes wiederholtes Öffnen der Schalen zu vermeiden, verbrachte ich diese in einen abgeschlossenen großen Glasbehälter, in dem ein Wassergefäß für dauernde Luftfeuchtigkeit sorgte. Die Behandlung der Tönnchen hatte nicht nur den Vorteil, die Imagines steril zum Schlüpfen zu bringen, es zeigte sich auch gegenüber den unbehandelten, daß eine Zerstörung durch Schimmelpilzbefall weitgehend ausgeschlossen wurde.

Für die Anzucht der Symbionten war es erforderlich, die Larven, Tönnchen und Imagines äußerlich vollkommen keimfrei zu machen. Es gelang dies auch unter Einhaltung der gebotenen Vorsichtsmaßregeln, wie sie bereits von verschiedenen Autoren für diesen Zweck eingehend beschrieben wurden, so daß ich auf eine nähere Ausführung verzichten kann. Vom Abflammen der Tiere — eine Methode, die verschiedentlich zu diesem Zweck angewendet wurde — nahm ich Abstand. Es besteht dabei immer die Gefahr, daß bei zu vorsichtigem Vorgehen nicht sämtliche Außenbakterien abgetötet werden, während andererseits bei den kleinen Objekten ein zu langes Einwirken leicht die Flora im Inneren des Körpers schädigt. Deshalb verwendete ich auch hier die bereits erwähnte Methode des Badens in 5% Tegelösung. Die Dauer der Einwirkung betrug 15 min, bei der Konzentration der Lösung also eine Zeit, in der mit Ausnahme von Sporen sämtliche Bakterien sicher abgetötet werden. Zur Beseitigung des Desinfektionsmittels wurden die Individuen in steriler physiologischer Kochsalzlösung mehrere Male abgespült, um dessen Verschleppen in die Nährböden und dadurch hervorgerufene Wachstumshemmung zu verhindern. Immer wieder durchgeführte Kontrollversuche ergaben niemals ein Wachstum. Anschließend wurde der Darm der Larven unter dem Binokular steril präpariert. Um eine Luftinfektion auszuschließen, wurde der Darm der Larven auch jetzt wieder in Tego kurze Zeit gebadet (3 min), mit NaCl-Lösung gespült und daraufhin in der Gesamtheit oder nach Abschnitten getrennt in flüssigen Nährboden gebracht. Bei den Imagines wurde in gleicher Weise verfahren.

Um sich ein Bild von der Darmflora machen zu können, wurde jeweils der Darm einiger weniger Versuchstiere herausgenommen, mittels zweier Objektträger gequetscht und als Ausstrichpräparat gefärbt. Ebenso wurden von allen auf flüssigen Nährböden aus Larven, Tönnchen und Imagines gewachsenen Bakterien Ausstriche angefertigt. Die Färbung erfolgte nach GRAM mit Gentianaviolett und LUGOLscher Lösung, um hierdurch einen Überblick über den Anteil der grampositiven und gramnegativen Bakterien und ihr Verhältnis zueinander zu gewinnen.

Die Anzucht der Bakterien aus den Anhängen bzw. den Darmabschnitten erfolgte auf flüssigen Nährböden. Anfängliche Versuche, den Inhalt der Blindsäcke bzw. Darmabschnitte auf festen Nährböden wie Agar-Agar-, Blut- oder Endoplatten auszustreichen, schlugen vollkommen fehl. Auch die sonst in der Diagnostik in Gebrauch befindlichen flüssigen Nährböden wie Fleischbrühe, Peptonwasser und Dextrosebouillon zeigten kein befriedigendes Wachstum. Insbesondere stimmten die in der Anreicherung angegangenen Bakterien nicht mit denen im mikroskopischen Ausstrichpräparat überein. Es mußte also angenommen werden, daß es sich bei den gezüchteten Bakterien nicht um den eigentlichen Symbionten, sondern um Zufallskeime handle. Dafür sprach auch die Tatsache, daß die positiven Kulturen sich im wesentlichen aus den Darmabschnitten züchten ließen, aber nicht aus den Blindsäcken. Es war deshalb zu vermuten, daß die physiologischen Bedingungen des Nährbodens nicht den Anforderungen eines Symbionten genügen, der ganz speziellen Verhältnissen angepaßt ist.

Auf Grund dieser Überlegung wurde nun damit begonnen, die übliche Nährbodengrundlage durch entsprechende Zusätze den physiologischen Bedingungen mehr und mehr anzupassen. Man mußte annehmen, daß in den besonderen symbiontischen Organen der Insekten den Bakterien Stoffe zur Verfügung stehen, die

die gebräuchlichen Nährböden nicht enthalten. Daß dies vitaminöse Substanzen sein müssen, dürfte wohl nicht von der Hand zu weisen sein. Zugaben von Einzelvitaminen führten nicht zum Ziel. Deshalb wurde nach einer Vielzahl von Versuchen zu einem natürlichen Vitaminkombinat übergegangen, wie es sich in Form von Hefeautolysat schon auf anderen Gebieten erfolgreich bewährt hat. Bei starker Beimpfung mit dem ganzen Darm führte diese Methode tatsächlich auch zu den ersten Ergebnissen, die aber noch nicht mit genügender Sicherheit reproduzierbar waren. Es mußten also noch weitere Unterschiede zwischen dem symbiontischen Leben und den Kulturbedingungen vorhanden sein. Die angestellten Überlegungen führten zu der Annahme, daß diese Unterschiede im Redoxpotential liegen könnten. Dahingehende Versuche mit Resazurin im Objektträgertest am Larvendarm bestätigten diese Vermutungen. Das Resazurin dient in diesem Falle als Indikator für die Höhe des Redoxpotentials. Nach diesem Test herrschen im Larvendarm mikroaerobe Bedingungen. Daher konnte durch einen entsprechenden Zusatz von Natriumthioglykolat ein Überwiegen der reduzierenden Substanzen und die Angleichung an die gegebenen physiologischen Verhältnisse erreicht werden. So wurde schließlich die gewünschte Gleichmäßigkeit der Züchtungsbefunde erzielt; die Verunreinigungen traten in ihrer Häufigkeit gegenüber der Regelmäßigkeit, mit der ein- und dasselbe Bakterium gezüchtet werden konnte, zurück.

Die endgültige Zusammensetzung des Nährbodens war folgende:

Fleischwasser	1000,0	Resazurin	0,001
Pepton	5,0	Difco-Hefeextrakt . . .	5,0
NaCl	3,0	Cystinhydrochlorid . . .	0,5
Na ₂ HPO ₄	2,0	pH	7,3
Natriumthioglykolat . . .	0,5		

Autoklavieren des Nährbodens ergab schlechteres Wachstum; deshalb wurde dreimal fraktionierte Sterilisation angewendet. Da der Nährboden äußerst empfindlich gegen Verunreinigungen ist, erfolgte die Beimpfung erst nach drei Tagen. Ein Blauwerden der Kulturflüssigkeit zeigt seine Unbrauchbarkeit an.

Von jeder dieser flüssigen Kulturen wurde, wie bereits erwähnt, ein Ausstrichpräparat nach GRAM gefärbt. Waren keine grampositiven Kokken und Stäbchen nachzuweisen, so beimpfte ich mit der Anreicherungskultur Endoplatten, die die beste Unterscheidungsmöglichkeit gestatten, um anschließend durch Isolierung Reinkulturen gewinnen zu können. Im anderen Fall erfolgte zuerst eine Übertragung auf Agarplatten, um vorher die grampositiven Bakterien nachzuweisen. Erst dann war ein Beimpfen der Endoplatten möglich. Das Isolieren der Bakterien — es handelte sich meistens um Mischkulturen von zwei, höchstens drei verschiedenen gramnegativen und sehr selten nur um grampositive Bakterien — war sehr mühsam und konnte nur durch wiederholte Überimpfung auf neue Platten erreicht werden. War auf diese Weise eine Reinkultur der einzelnen auftretenden Bakterienarten erzielt, dann wurden Stichkulturen angelegt, um die genaue diagnostische Bearbeitung der Einzelkulturen auf später verschieben zu können. Es war nämlich in der Fangzeit bei der übergroßen Fülle von Arbeit, die durch das Sammeln des Materials, das Bearbeiten, Präparieren und Anzüchten anfiel, nicht möglich, auch noch diese zeitraubende Bestimmungsarbeit durchzuführen.

Deshalb wurden die Reinkulturen später nochmals auf Endoplatten ausgestrichen, um hier durch gleichmäßig lange Wachstumsdauer, zunächst einmal nur an Hand der Morphologie der gleich alten Kolonien und unter Berücksichtigung eines gramgefärbten Ausstriches, die Identität der einzelnen Kulturen festzustellen. Denn nur wirklich gleich lang bebrütete Kolonien gestatten dem Aussehen nach einen Vergleich, da die äußere Beschaffenheit der Kolonien im Verlaufe des Wachstums sich ständig verändert. Anschließend wurden die Bakterien dann einer ge-

neuen Differenzierung unterworfen, indem ihr Verhalten auf verschiedenen Nährböden, wie sie der Diagnostik zur Verfügung stehen, geprüft wurde.

Beiträge zur Morphologie der Trypetidensymbiose

STAMMER hat in seiner Arbeit über „Die Bakteriensymbiose der Trypetiden“ (1929) festgestellt, daß alle von ihm untersuchten Arten eine mehr oder minder innige Bakteriensymbiose aufweisen (S. 521). Er konnte zunächst die Ergebnisse PETRIS an *Dacus oleae* (Subfamilie Dacinae), die die höchste Ausbildung der Symbiontenorgane zeigt, voll bestätigen. Denn nicht nur die Larve weist vier ungeteilte, bakteriengefüllte Blindsäcke auf, sondern auch die Imago beherbergt die Symbionten in einem eigenen Kopfgang. Die Bakterien werden durch gut ausgebildete Beschmierorgane auf die Eier, und zwar bei deren Ablage, übertragen.

Innerhalb der Subfamilie Tephritinae weisen die Tribus Tephritini und Schistopterini mit Ausnahme von *Ensina sonchi* ebenfalls als Larven die vier mit Bakterien gefüllten Blindsäcke auf, ebenso besitzen die Imagines als Beschmiereinrichtungen Übertragungsrinnen und die schlitzförmige Verbindung zwischen Darm und Vagina. Der Mitteldarm der Imago zeigt außerdem einen Abschnitt, der etwas erweitert und mit kurzen, unregelmäßigen Zotten bedeckt ist. Da dieser Teil des Darmes die Hauptmasse der symbiontischen Bakterien der Imago enthält, ebenso Veränderungen am Epithel festzustellen waren, kann dieser Mitteldarmabschnitt als Sitz der Symbionten angesprochen werden. Schließlich hat sich dieses Organ bei *Acanthophilus helianthi* und *Sphenella marginata* noch weiter entwickelt.

Die Angehörigen der übrigen Tribus aus der Subfamilie Tephritinae besitzen kleine, rundliche, bakterienfreie Blindsäcke. Auch den Imagines fehlen „besondere organologische Differenzierungen zur Aufnahme und Übertragung der Symbionten“ (STAMMER 1929, S. 511). Die Bakterien liegen deshalb im Darmkanal der Larven und Imagines. Lediglich die schlitzförmige Verbindung zwischen Enddarm und Vagina, die STAMMER als eine Anpassung an die Symbiose auffaßt, findet sich auch hier. Dieselben Verhältnisse konnten bei den Angehörigen der Subfamilie Trypetinae festgestellt werden.

Bei meinen Untersuchungen konnte ich diese Angaben voll bestätigen. Neu untersucht wurde von mir die Gattung *Euaresta* LOEW., von der ich Larven und Imagines von *Euaresta guttata* aus den Infloreszenzen von *Cirsium palustre* zog. Sie weisen gleichfalls die für die Tribus Tephritini charakteristischen Einrichtungen auf. Die Gattung *Ictericus*, die zur Tribus Xyphosiini zählt, hat ebenso wie *Xyphosia miliaria* kleine, ungefüllte Blindsäcke. Imagines standen mir nicht zur Verfügung. Von der Tribus Terellini konnte ich noch *Ceriocera ceratocera*

untersuchen. Auch hier fehlen wie bei den anderen hierzu gehörigen Gattungen eigene symbiontische Organe. Die Blindsäcke sind klein, rundlich und bakterienfrei. Imagines dieser Art sind nicht geschlüpft.

Alle von mir neu untersuchten, zur Subfamilie Trypetinae gehörenden Arten besitzen, ebenso wie die bereits behandelten, keine besonderen symbiontischen Einrichtungen. Das gilt für die Gattungen *Myiolia*, *Rhagoletis*, *Phagocarpus*, *Platyparea* und *Acidia*.

Bei allen diesen Untersuchungen fiel mir immer wieder auf, daß mit Ausnahme der Tribus Tephritini die Ausbildung der Blindsäcke verschieden war. Bei eingehendem Vergleich kam ich zur Feststellung, daß die Größe und Form der nicht gefüllten, bakterienfreien Blindsäcke sich mit der Lebensweise der Larven verändern und nicht den Verwandtschaftsbeziehungen gemäß eine mehr oder minder große Ähnlichkeit zeigen. Alle Larven der in Früchten lebenden Trypetidenarten haben sehr lange und dünne Anhänge. Diese gilt für alle Arten der Gattung *Rhagoletis*, für *Ceratitis capitata*, *Phagocarpus permundus* und *Myiolia lucida*.

Auch die Anhänge der Larven der Spargelfliege (*Platyparea poeciloptera*) sind lang und dünn gestaltet. Wieweit sich diese Feststellung auf alle Stengelparasiten ausdehnen läßt, kann ich nicht sagen, da mir zur Untersuchung nur diese eine Art zur Verfügung stand. Andererseits besitzen alle Larven, die Gallen an Stengeln, bzw. gallenartige Anschwellungen in Blütenböden verursachen, nur ganz kleine Blindsäcke, so daß der Übergang vom Proventriculus in den Mitteldarm ein kragenartiges Aussehen annimmt. Da diese Erscheinung sich nicht allein auf die Arten der Gattung *Euribia* beschränkt, sondern auch bei *Terellia*- und *Orellia*-Arten vorkommt, scheint sie nicht gattungsgebunden, sondern durch die Lebensweise bedingt zu sein. Die Larven der in den Achaenen der Blütenköpfe lebenden Arten, die keine Deformationen hervorrufen, sind zwar etwas größer, jedoch im Verhältnis zu denen der Tephritinae immer noch als klein und rundlich anzusprechen. In der Form jedoch stehen sie ihnen am nächsten, und so liegt die Vermutung nahe, daß sich aus ihnen die großen, bakteriengefüllten Blindsäcke der Tephritini entwickelt haben. Dies ließe sich mit der Lebensweise in Einklang bringen, da meines Erachtens gerade die in Infloreszenzen lebenden Arten mit ihrer Nahrung am stärksten spezialisiert sind.

Bei der von mir untersuchten Blattminiererart, *Acidia cognata*, sind die Blindsäcke ebenfalls rundlich, klein und ungefüllt. Sie sitzen unmittelbar am Beginn des Mitteldarmes, der zunächst halsartig verdünnt ist und sich dann ohne Übergang in ein sackartiges Gebilde verbreitert, eine Erscheinung, die sonst bei Trypetidenlarven nicht zu beobachten ist. Einen ähnlichen Bau zeigten die wesentlich kleineren

Larven anderer Blattminierer, bei denen es sich wahrscheinlich um *Trypeta*-Arten gehandelt hat.

Bakteriologische Untersuchungen

1. Die Symbionten der Subfamilie Trypetinae und Tephritinae

Wie bereits erwähnt, lieferte der färberische Ausstrich, der unmittelbar von den Blindsäcken und den Darmabschnitten der Larven und dem Darm der Imagines angefertigt wurde, in allen Fällen das Bild gramnegativer Stäbchen. Die Anwesenheit grampositiver Kokken bzw. Stäbchen konnte auf diese Weise nicht festgestellt werden. Gleichzeitig bestätigte sich die von STAMMER (1929) gemachte Beobachtung, daß die Bakterien im Darm der Trypetiden im allgemeinen einen Dimorphismus zeigen, d. h., daß die Stäbchen im Darm der Larve als Kurzstäbchen vorliegen, im Darm der Imago eine gewaltige Verlängerung erfahren, sich aber kurz vor der Eiablage und damit der Übertragung auf die Nachkommen wieder zu Kurzstäbchen umbilden. Obwohl allerdings diese am Ausstrichpräparat gemachte Feststellung allein noch nicht beweist, daß es sich hierbei um ein und denselben Mikroorganismus handeln müsse, erscheint dies doch weitgehend wahrscheinlich. In den Ausstrichen, die nach dem Anwachsen der Bakterien aus der Kulturflüssigkeit gemacht wurden, scheinen jedoch die als lange Stäbchen oder als lange Fäden auftretenden gramnegativen Bakterien nicht immer mit dem eigentlichen Symbionten identisch zu sein, da sie nur in ganz seltenen Fällen vorhanden waren, während sich in sämtlichen Ausstrichpräparaten zusätzlich gramnegative Kurzstäbchen nachweisen ließen, und zwar in größerer Menge als alle übrigen Elemente. Trotz dieser Tatsache soll aber nochmals betont werden, daß die unter dem Mikroskop feststellbare Länge und Dicke eines Bakteriums kein hinreichendes Kriterium ist, da es bekanntlich sehr leicht möglich ist, beide durch Wachstum auf verschiedenen Nährböden zu verändern. Bei rascher Vermehrung werden die Bakterienpopulationen fast immer von Kurzstäbchen gebildet, während bei der Abnahme der Teilungsfreudigkeit infolge Erschöpfung des Nährbodens oder auf primitiven Mangelnährböden mehr und mehr das Auftreten von langen Stäbchen und häufig sogar Fäden zu beobachten ist.

Weiterhin treten in den Ausstrichpräparaten aus den flüssigen Spezialnährböden grampositive Bakterien nur selten auf. Ich konnte immer wieder die Beobachtung machen, daß grampositive Kokken nur in Ausnahmefällen im Darm der Larven in einer Häufigkeit von etwa 2—5% vorhanden waren, bei manchen Arten jedoch überhaupt nie. Dabei scheinen die Futterpflanzen oder deren Standort eine gewisse Rolle zu spielen, da z. B. bei den Larven von *Tephritis bardanae* aus

Arctium lappa von Schuttplätzen immer wieder eine Verunreinigung durch grampositive Kokken festzustellen war. Das Verhältnis von grampositiven Kokken zu gramnegativen Stäbchen nach dem Wachstum auf dem flüssigen Nährboden, das gleichzeitig als Maß für die tatsächlich im Darm befindliche Zahl gelten kann, beträgt etwa 1:1000. Dasselbe gilt auch für die gezüchteten, langen, grampositiven Stäbchen. Die Zahl der Imagines dagegen, die grampositive Elemente in ihrer Darmflora aufwiesen, vor allem derjenigen, deren Wachstum nicht unter sterilen Bedingungen erfolgte, war größer als bei den Larven.

Trotzdem war das Verhältnis grampositiv zu gramnegativ im Darm selbst das gleiche wie bei den Larven. So scheint die Annahme gerechtfertigt, daß es sich hier um Zufallskeime handelt, die mit der Nahrung aufgenommen werden, aber infolge des Vorhandenseins von gramnegativen Bakterien keine stärkere Vermehrung entfalten können. Kulturen aus den eigentlichen Symbiontenorganen der Tephritini wiesen dagegen niemals grampositive Elemente auf.

Wesentlich schwieriger gestaltete es sich jedoch, aus den anwesenden gramnegativen Bakterien den eigentlichen Symbionten herauszufinden. Schon sehr bald zeigte sich, daß vor allem aus den proventriculären Blindsäcken der Tephritisarten — aus diesen fast immer in Reinkultur — aber auch aus den Larven und Imagines der übrigen Arten sich mit größter Regelmäßigkeit ein und derselbe Keim züchten ließ. Seine leuchtend roten Kolonien auf Endoplatten fielen sofort auf. Sie sind auf die Bildung von aldehydartigen Substanzen aus dem Nährboden zurückzuführen, welche die durch zugesetztes Natriumbisulfit farblos gemachte Fuchsinlösung im Nährboden wiederum rot färbt. Alle sonstigen mit diesem Keim vergesellschaftet wachsenden gramnegativen Bakterien besaßen diese Eigenschaft nicht und traten niemals mit derselben Häufigkeit auf. Darauf jedoch werde ich später noch zurückkommen.

Es lag nun nahe, das Auftreten dieses Bakteriums bei allen gefundenen Trypetidenarten zu verfolgen. Das Bakterium ließ sich aus fast allen Larven bis zu 95% Häufigkeit züchten, während es bei den Puppen nicht immer möglich war den Keim zu kultivieren. Es läßt sich dies sehr leicht aus der Beobachtung erklären, daß, wie auch PETRI (1910) und STAMMER (1929) schon beschrieben haben, nur wenige Bakterien das Puppenstadium überdauern. Daß in diesem Stadium, wie PETRI (1910) behauptet, die Bakterien ihre Färbbarkeit verlieren, möchte ich bezweifeln. Ihre geringe Zahl wird es wohl wahrscheinlich unmöglich machen, sie auf dem Schnittpräparat aufzufinden. Bei den eben geschlüpften und nur wenige Tage alten Imagines trat das Bakterium ebenfalls mit großer Regelmäßigkeit auf, während bei einigen Wochen alten Fliegen, insbesondere aber bei gekescherten bzw. unter nicht sterilen Verhältnissen aufgezogenen, eine Kultivierung nur in etwa 20%.

der Fälle möglich war. Denn die auftretenden Begleitkeime, die auch sonst außerhalb des Darmes unter saproben Verhältnissen zu leben vermögen, scheinen sich in der Kulturflüssigkeit, auch wenn sie nur in geringerer Anzahl vorliegen, besser zu vermehren. PETRI selbst war ja der Ansicht, daß der Symbiont „ein stetes Verhältnis mit dem Entwicklungszyklus der Fliege habe und seine Vermehrung in dem Innern des Gastes derart von der physiologischen Tätigkeit und dem anatomischen Baue dieses letzteren abhängt, daß er von ihm geschieden, sehr selten auf den künstlichen Kultur Nährschichten saprophytisch vegetieren kann. Ein zu rascher Übergang von dem symbiontischen zu dem autotrophischen saprophytären Zustand tötet ihn“. Soweit PETRI (1910, S. 360).

Dennoch ist es gelungen, den Symbionten, auch die für *Dacus oleae* beschriebene *Pseudomonas savastanoi*, zu züchten. Ich möchte dies darauf zurückführen, daß unter anderem der Zusatz von Hefeautolysat zur Kulturflüssigkeit bei den Bakterien die sonst von den Epithelzellen des Darmes und der Blindsäcke abgeschiedenen Hormone und die mit der Nahrung in den Darmtrakt aufgenommenen Vitamine ersetzt, so daß ähnliche Lebensbedingungen wie im Organismus selbst geschaffen sind. Im übrigen ist bekannt, daß, wenn die großen Schwierigkeiten der ersten Anzucht im künstlichen Nährmedium überwunden sind, einer Weiterkultivierung auf gewöhnlichen Nährböden nichts mehr im Wege steht.

Die Isolierung des auf Endoplatten leuchtendrot wachsenden Keimes ergab in allen Fällen ein Bakterium, das unter bestimmten Umständen, in der Regel bei weniger günstigen, d. h. kargen Lebensbedingungen, ein Pigment in den Nährboden abscheidet, das von grüner Farbe, fluoreszierend und wasserlöslich ist.

Durch das Auftreten dieses Pigments ist die Zugehörigkeit der Spezies zur Gattung *Pseudomonas*, Familie Pseudomonadaceae, gesichert. Noch nicht gesichert jedoch war, ob es sich bei den isolierten Bakterien jeweils um die gleiche *Pseudomonas*-Art handelte.

Es kam mir nun in erster Linie darauf an, bei allen untersuchten Trypetidenarten, die eingangs aufgeführt sind, dieses fast in allen Kulturen wiederkehrende Bakterium zu isolieren. Denn es schien zunächst nicht wahrscheinlich, daß die in verschiedenen Pflanzenteilen lebenden Arten der Trypetiden alle dieselbe *Pseudomonas*-Art als Symbionten in ihrem Darmtrakt besitzen sollten. Deshalb wurden alle „roten Keime“, die aus den in verschiedenen Infloreszenzen der einzelnen Kompositenarten sowie in Stengeln, Blättern und Früchten vorkommenden Trypetidenarten isoliert wurden und wegen ihres grünen, fluoreszierenden Pigmentes als Angehörige der Familie Pseudomonadaceae anzusprechen waren, auf ihre sonstigen Eigenschaften eingehend geprüft, um sie genau zu identifizieren.

Sehr auffällig war dabei die Feststellung, daß bei all diesen gezüchteten „roten Keimen“ nach einiger Zeit auf der Endoplatte neben, bzw. unter den leuchtendroten Kolonien farblose helle Kolonien zum Vorschein kamen. Ich habe in jedem Falle den roten Keim vom farblosen isoliert und ihn auf seine Eigenschaften hin geprüft, da auch der farblose Keim starke Fluoreszenz aufwies.

In der folgenden Tabelle werden nun die symbiontischen Bakterien in ihren Kultureigenschaften aufgeführt. Ich halte mich hierbei an den Bestimmungsschlüssel in BERGEYS Manual, weil nach diesem Prinzip noch am ehesten eine Einordnung in das System möglich erscheint. Alle „roten Keime“, die von den in Infloreszenzen lebenden Vertretern der Subfamilie Trypetinae *ohne* eigene symbiontische Einrichtungen, ebenso wie der Subfamilie Tephritinae *mit* zum Teil hochentwickelten Symbiontenorganen stammen, zeigen keinerlei Unterschiede in ihren Kultureigenschaften. Dasselbe gilt auch für die aus der übrigen Subfamilie der Trypetinae gezüchteten Bakterien, deren Larven in verschiedenem Milieu parasitieren.

Ich beschränke mich deshalb darauf, jeweils nur eine oder zwei symbiontische Bakterien aus den in verschiedenen Pflanzenteilen lebenden Arten anzuführen.

Aus den angeführten Daten ist zunächst zu ersehen, daß die rote und die farblose Modifikation jedes Bakteriums vollkommen identisch sind. Es gelingt nicht, den Keim in seiner roten Form rein zu züchten; ebenso spalten auch bei der farblosen Variante einzelne Kolonien wiederum auf und liefern die rote Modifikation. Auch bei der einmal durchgeführten Einzellkultur mittels Tuschetropfen konnte gezeigt werden, daß sich aus einer einzelnen Zelle einer „roten Kolonie“, in der Folge wieder rote und farblose Kolonien ergaben, womit der Beweis geliefert wird, daß es sich bei den roten und farblosen Kolonien um einen auch sonst bei den Bakterien häufig zu beobachtenden Formenwechsel (etwa ähnlich dem SR-Formenwechsel, VW-Formenwechsel, Wechsel zwischen spezifischer und unspezifischer Phase bei den Salmonellen) handelt. So müssen die rote und die farblose Modifikation als zu einer Art gehörig aufgefaßt werden.

Aus der Tabelle 2 geht weiter hervor, daß die Symbionten der in den verschiedenen Pflanzenteilen lebenden Arten unter sich wiederum völlig identisch sind. Ich möchte lediglich auf einige geringfügige Unterschiede hinweisen, die in minimalen Schwankungen des p_H -Wertes und weiterhin in der Peptonisation von Lackmusmilch liegen. So erscheint die hierbei entstehende klare Flüssigkeit, z. B. bei der roten und farblosen Modifikation des Bakteriums aus *Rhagoletis alternata* und *Acidia cognata* sowie bei der farblosen Modifikation aus der Spargelfliege (*Platyparea poeciloptera*), nicht hellgelb, sondern leicht bläulich.

Diese Modifikation dürfte sich in gleicher Weise erklären lassen und vermag nichts an der Tatsache zu ändern, daß es sich bei den Bakterien, die aus den in verschiedenen Pflanzen und Pflanzenteilen lebenden Trypetidenarten gezüchtet wurden, um ein und denselben Symbionten handelt.

Obwohl in BERGEYS Manual 122 verschiedene *Pseudomonas*-Arten, die grünfluoreszierendes Pigment abscheiden, beschrieben sind, läßt sich der Symbiont mit keiner der aufgeführten identifizieren. Ich möchte ihn seiner hervorstechendsten Eigenschaft, seiner Veränderungsfähigkeit wegen, *Pseudomonas mutabilis* n. sp. nennen.

Daß es sich bei *Pseudomonas mutabilis* tatsächlich um das symbiontische Bakterium der beiden Subfamilien der Tephritinen und Trypetinen handeln muß, läßt sich durch verschiedene Tatsachen noch erhärten.

Es erscheint zunächst sehr merkwürdig und widerspricht auch allen Erwartungen, daß, obwohl die Larven in ganz verschiedenen Pflanzen und Pflanzenteilen leben, sich ein in allen Kultureigenschaften vollkommen übereinstimmendes Bakterium züchten ließ. Ich möchte diese verblüffende Tatsache als ersten Beweis dafür anführen, daß es sich bei diesem Bakterium um den Symbionten handelt. Eine Verunreinigung des Untersuchungsmaterials selbst infolge unsteriler Präparation ist nicht denkbar, da der Darm nach der Präparation nochmals kurz keimfrei gemacht wurde und somit alle nur möglichen Vorkehrungsmaßregeln getroffen waren. Der stärkste Einwand, die Larven hätten während ihres Lebens in den Pflanzen Gelegenheit, dieses Bakterium mit der Nahrung aufzunehmen — ein Einwand, der bei den steril geschlüpften Fliegen in direkter Form entfällt —, ist selbstverständlich berechtigt. Um jedoch darüber Klarheit zu erhalten, habe ich immer wieder Kontrollversuche mit den Blütenböden der verschiedenen Kompositenarten, mit den in Frage kommenden Stengeln, Blättern und Früchten angestellt, und zwar nach oberflächlicher Sterilisation durch Abflammen oder durch Abspülen in Formalinlösung; teilweise ließ ich sie vollkommen unbehandelt. Das Ergebnis zeigte, daß aus allen Versuchsobjekten neben gramnegativen Stäbchen fast immer auch grampositive lange Stäbchen und grampositive Kokken züchtbar waren. Selbstverständlich handelt es sich bei den gramnegativen — allerdings in geringer Zahl — manchmal auch um *Pseudomonas*-Arten. Das ist nicht verwunderlich, da ja ein großer Teil von letzteren als auf Pflanzen vorkommend, zum Teil sogar als pflanzenpathogen beschrieben ist. Doch stimmten die Eigenschaften dieser Arten nicht mit denen von *Pseudomonas mutabilis* überein. Da zu wiederholten Malen auch die Blütenböden, Früchte und Stengel untersucht wurden, aus denen die Larven entnommen waren, und es auch so nicht glückte, den Symbionten daraus zu züchten, halte ich eine

Tabelle 2. *Symbiontische Bakterien der Subfamilie Trypetinae und Tephritinae*

Symbionten der und zwar aus	Infloreszenzenbewohner		Fruchtminierer		Blattminierer		Stengelminierer	
	<i>Tephritis arnicae</i>		<i>Ceratitis capitata</i>		<i>Acidia cognata</i>		<i>Platyparea pocilloptera</i>	
	rote	farblose	rote	farblose	rote	farblose	rote	farblose
	Variante		Variante		Variante		Variante	
Färbung	gramnegativ		gramnegativ		gramnegativ		gramnegativ	
Größe	$0,6-0,8 \mu \times 1,5-4,0 \mu$		$0,6-0,8 \mu \times 1,5-4,0 \mu$		$0,6-0,8 \mu \times 1,5-4,0 \mu$		$0,6-0,8 \mu \times 1,5-4,0 \mu$	
Beweglichkeit. . .	1-4 Geißeln, lebhaft		1-4 Geißeln, lebhaft		1-4 Geißeln, lebhaft		1-4 Geißeln, lebhaft	
Koloniebildung auf Agar	flach durchscheinend, feucht glänzend, grün- fluoreszierendes Pigment		flach durchscheinend, feucht glänzend, grün- fluoreszierendes Pigment		flach durchscheinend, feucht glänzend, grün- fluoreszierendes Pigment		flach durchscheinend, feucht glänzend, grün- fluoreszierendes Pigment	
Dextrose-Bouillon .	Hautbildung		Hautbildung		Hautbildung		Hautbildung	
Dextrose- Gärröhrchen . . .	Säurebildung ohne Gas, aerob		Säurebildung ohne Gas, aerob		Säurebildung ohne Gas, aerob		Säurebildung ohne Gas, aerob	
Laktose- Gärröhrchen . . .	keine Säurebildung		keine Säurebildung		keine Säurebildung		keine Säurebildung	
Temperaturoptimum	20° C		20° C		20° C		20° C	
Indolbildung . . .	—		—		—		—	
H ₂ S-Produktion . .	—		—		—		—	
Nitratreduktion . .	—		—		—		—	
Lackmusmilch . . .	peptonisiert hellgelb		peptonisiert hellgelb		peptonisiert bläulich		peptonisiert hellgelb, bläulich	
Gelatineverdaunung	+		+		+		+	
Starkeabbau . . .	—		—		—		—	

Harnstofffanggriff . .	+		+		+		+		+	
	p _H -Wert		p _H -Wert		p _H -Wert		p _H -Wert		p _H -Wert	
Verwertung von										
Glukose . . .	7,4	7,7	7,4	7,35	7,4	7,35	7,4	7,45	7,4	7,4
Laktose . . .	7,8	7,7	7,75	7,75	7,75	7,75	7,85	7,75	7,85	7,8
Maltose . . .	7,85	7,6	7,8	7,75	7,8	7,75	7,8	7,75	7,8	7,75
Saccharose . .	7,85	7,6	8,00	7,7	7,7	7,7	7,7	7,8	7,8	7,85
Raffinose . .	7,75	7,7	7,75	7,7	7,7	7,7	7,75	7,8	7,45	7,4

Infektion durch Nahrungsaufnahme im Falle des symbiontischen Bakteriums für ausgeschlossen. Die Einwanderung der grampositiven Stäbchen und Kokken jedoch kann in der Hauptsache auf diese Weise erklärt werden, ebenso die der übrigen gramnegativen Arten. Für beide Fälle läßt sich ein Überdauern des Puppenstadiums feststellen, da sich manchmal auch aus den Tönnchen grampositive und andere gramnegative Elemente kultivieren ließen. Trotzdem möchte ich nochmals darauf hinweisen, daß die Zahl der Begleitkeime in den einzelnen Individuen nie über drei Arten hinausging, in vielen Fällen sogar überhaupt keine Begleitkeime auftraten. Als eines der hervorstechendsten Beispiele möchte ich die *Ceratitis*-Larven nennen, die keine eigentlichen Symbiontenorgane besitzen. Aus allen in derselben Frucht minierenden Larven ließ sich *Pseudomonas mutabilis* in Reinkultur züchten. Aus der befallenen Frucht dagegen war der Symbiont nicht kultivierbar, jedoch ein anderer gramnegativer Keim mit Kolonien von schleimiger Beschaffenheit.

Einen weiteren Beweis, daß es sich bei dem gezüchteten Bakterium um den Symbionten handelt, sehe ich darin, daß sich gerade aus den symbiontischen Organen der Tribus Tephritini zu etwa 85—90% *Pseudomonas mutabilis* in Reinkultur züchten ließ. Daß dies nicht ausschließlich der Fall war, ist selbstverständlich, da durch die Abtrennung der einzelnen Darmabschnitte mit dem Skalpell eine Bewegung und damit Verschiebung der Bakterien innerhalb des Darmtraktes nicht immer ganz zu vermeiden ist. Schließlich besteht auch keine Gewähr dafür, daß gramnegative Bakterien grundsätzlich nicht in der Lage sein sollten, vom Mitteldarm her in die Blindsäcke der Larve einzuwandern. Ebenso zeigt es sich, daß auch bei den Imagines, die eine besondere Region des Mitteldarmes als Wohnsitz der Bakterien haben, *Pseudomonas mutabilis* wesentlich häufiger auftritt als im Vorder- und Enddarm. Doch gilt auch hier das für das Abtrennen der Abschnitte Gesagte. Außerdem wird nach PETRI (1910) und STAMMER (1929)

kurz vor der Verpuppung ein großer Teil der Bakterien über den Enddarm abgestoßen. Allerdings gelang es mir trotz mehrmaliger Versuche nicht aus den Abscheidungen der Larven die Bakterien zu züchten. Sie blieben in allen Fällen steril. Bei den Imagines war, wie schon erwähnt, die Kultivierung wesentlich schwieriger, vor allem bei den gekescherten und den in Berührung mit den Infloreszenzen geschlüpften Exemplaren. Besonders häufig zeigte sich der Symbiont in Kulturen aus dem Eileiter und dem Ovipositor legefähiger Weibchen, wohin die Bakterien zur Übertragung auf die Eier verbracht werden.

Tabelle 3.

Untersuchte Arten	Larven		Puppen		Imagines	
	I	II	I	II	I	II
<i>Tephritis conura</i>	16	16	0	0	43	32
<i>Tephritis dilacerata</i>	0	0	7	5	71	53
<i>Tephritis cometa</i>	11	9	0	0	18	14
<i>Trypanea stellata</i>	18	13	0	0	21	12
<i>Xyphosia miliaria</i>	15	15	0	0	0	0
<i>Chaetostomella onotrophes</i>	44	31	0	0	25	15
<i>Rhagoletis cerasi</i>	55	42	0	0	0	0
<i>Rhagoletis alternata</i>	29	18	8	5	63	41
<i>Platyparea poeciloptera</i>	30	22	6	2	20	11
<i>Ceratitis capitata</i>	15	15	0	0	0	0

I = Zahl der untersuchten Individuen; II = Häufigkeit des Auftretens des Symbionten.

Zur Veranschaulichung der Züchtungsergebnisse mag die beigefügte Tabelle dienen, die die Verhältnisse bei einigen Arten wiedergibt, von denen ich Gelegenheit hatte, eine genügende Anzahl von Individuen zu untersuchen. Denn ein Beweis mittels statistischer Methoden ist nur dann berechtigt, wenn durch die Masse die „Gefahr der kleinen Zahl“ ausgeschaltet werden kann.

Der lückenlose Beweis, daß *Pseudomonas mutabilis* der Symbiont ist, ist jedoch nur dann erbracht, wenn alle Entwicklungsstufen mit ihm infiziert bzw. vergesellschaftet sind. Daß auch bei den Puppen die Kultur möglich war (zu etwa 50%), habe ich bereits ausgeführt, obwohl gerade hier nur ganz wenige Bakterien dieses Stadium überdauern und die Schwierigkeit der Anzucht deshalb besonders groß ist. Das wichtigste Zwischenglied jedoch würde das abgelegte Ei darstellen, das nach den Untersuchungen von STAMMER und PETRI (1910) beim Durchgang durch den Ovipositor mittels der Übertragungsrinnen mit dem Symbionten versehen wird. „Es ist mit einer Schleimhaut bedeckt, die der Vagina entstammt. Diese Schleimschicht ist am schwächsten am Mikropylenpol ausgeprägt, dagegen findet sich an dem bei der Eiablage vorangeleitenden

unteren Pol stets ein großer Schleimklumpen, in dem zahlreiche Bakterien eingebettet liegen“ (STAMMER 1929, S. 503). Leider gelang es nur, die Spargelfliege (*Platyparea poeciloptera*) und *Rhagoletis alternata* zur Eiablage zu bringen. Obwohl die Imagines der übrigen Arten bei Fütterung ein Alter von drei bis vier Wochen erreichten und durch Zugabe von Blütenköpfen ihre natürliche Umgebung nachgeahmt wurde, kam es nie zur Kopulation und Eiablage. Die Eier ließ ich in kleinsten Stückchen des Stengels bzw. der Frucht ablegen, welche vorher völlig keimfrei gemacht waren. In beiden Fällen ließen sich von allen untersuchten Eiern die Symbionten, d. h. *Pseudomonas mutabilis* züchten. Damit war die Beweiskette geschlossen und wenigstens bei diesen beiden Arten ein Zweifel daran, daß es sich bei der gezüchteten *Pseudomonas*-Art um den Symbionten handelt, völlig ausgeschlossen. Kontrollversuche, die gleichzeitig an Stengeln und Früchten vorgenommen wurden, verliefen negativ. Ebenso zeigten steril aus den Ovarien präparierte Eier niemals ein Wachstum.

Da es möglich war, von einigen Arten der Trypetiden genügend viele Larven zu erhalten, wurde auch der Agglutinationstest durchgeführt. Zur Verfügung standen Larven von *Tephritis conura*, *Rhagoletis cerasi* und *Platyparea poeciloptera*. Von ersterer Art wurden die Blindsäcke von etwa 350—400 Larven, von den beiden übrigen eine fast gleich große Anzahl von Därmen verarbeitet. Drei Kaninchen wurden über 6 Wochen hinweg, zweimal wöchentlich mit 0,5 cm³ der aus den Blindsäcken bzw. Därmen gewonnenen und mit Phenol konservierten Bakterienaufschwemmung (also insgesamt 6 cm³) intravenös immunisiert. Die Agglutination mit den jeweils aus der zugehörigen Larvenart gezüchteten Bakterien erfolgte bis zu einem Titer von 1:100, die übrigen aus anderen Trypetidenarten kultivierten *Pseudomonas mutabilis*-Keime wurden unterschiedlich bis 1:25 bzw. 1:50 agglutiniert.

Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, daß es sich bei den gezüchteten Bakterien um Varianten von *Pseudomonas mutabilis* handelt, bei dem Teilantigene um ein geringes gegeneinander variieren und so die Titerunterschiede bedingen. Eine Agglutination mit *Pseudomonas savastanoi*, *Agrobacterium luteum* (s. S. 506) und anderen Begleitkeimen war nicht zu beobachten.

Damit scheint nun gesichert, daß die aus den einzelnen Trypetidenarten isolierten symbiontischen Bakterien dieselben Kultureigenschaften besitzen und sich ihren agglutinatorischen Fähigkeiten zufolge als Varianten von *Pseudomonas mutabilis* erweisen. Auf Grund dieser Tatsachen kann als erwiesen gelten, daß *Pseudomonas mutabilis* der Symbiont aller untersuchten Angehörigen der Subfamilie Trypetinae und Tephritinae ist.

2. Die Symbionten der Subfamilie Dacinae

Über die Symbiose der Subfamilie Dacinae liegen drei Arbeiten von PETRI vor. Seine letzte Veröffentlichung stammt aus dem Jahre 1910, in der er die symbiontischen Einrichtungen von *Dacus oleae*, die wechselseitigen Beziehungen zwischen Wirt und Symbionten und deren Übertragung eingehend beschreibt. Nach den Angaben von PETRI handelt es sich um einen Mikroorganismus, der auch auf den Olivenbäumen vorkommt und von ihm *Ascobacterium luteum* genannt wird. Es bildet in den Blindsäcken der Larve mit dem eigentlichen Symbionten Mischkolonien. Als diesen tatsächlichen Symbionten vermutet PETRI (1910) das *Bacterium savastanoi* SMITH, das gleichzeitig als der Erreger der Rogna (Rotz) bei den Olivenbäumen angesehen wird. Es ist ihm nicht gelungen, das *Bacterium savastanoi* SMITH aus *Dacus* selbst zu kultivieren. Er schreibt: „Das einzige Mittel, um seine Identität mit dem Rotzbacillus nachzuweisen, besteht darin, daß man die Bakterien der Schlunddrüse, welche aus einer vor kurzem in sterilem Mittel geborenen Fliege stammen, den Olivenästen einimpft. So kann man gewöhnlich typische Rotztuberkel erlangen, aus welchen man durch die üblichen Verfahren einen Organismus isolieren kann, der mit dem *Bacterium savastanoi* identisch ist. Solange es nicht möglich ist, ein Nährsubstrat zu erlangen, welches eine vom Insektendarme direkt isolierte Bakterienkultur gestattet, kann der Zweifel, ob *Bacterium savastanoi* wie *Ascobacterium luteum* eine Unreinigkeit darstellen, nicht gänzlich schwinden.“ Soweit die Ausführungen PETRI's (1910, S. 360). Vielleicht darf bereits an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, daß es sich bei den aus *Dacus* entnommenen und in die Olivenbäume überimpften Bakterien nur um eine Mischpopulation beider handeln konnte.

Ferner behauptet PETRI (1910), daß das *Ascobacterium* lediglich von der Larve auf die Imago weitergegeben werden kann — eine Übertragung auf das Ei kommt nur in seltenen Fällen vor —, der Symbiont jedoch bei der Eiablage durch Absonderung der Analdrüsen übertragen wird. Das *Ascobacterium* dagegen soll nach PETRI sogar über den After in den Enddarm eindringen und von hier aus erst in die Blindsäcke einwandern.

Über das *Ascobacterium luteum* liegen ferner Arbeiten von PETRI aus den Jahren 1904 und 1905 vor, in denen er das aus den Blindsäcken gezüchtete *Ascobacterium* nach verschiedenen Richtungen hin beschreibt. Er war damals noch der Ansicht, daß dieses *Ascobacterium* der Symbiont von *Dacus oleae* sein müsse. Leider sind seine Angaben, die sich lediglich auf eine genaue Beschreibung der Kolonien, deren Größe und Farbe beschränken, für unsere heutigen Anforderungen nicht genügend, um damit ein Bakterium hinreichend zu identifizieren. Das einzige genauere Kennzeichen liegt vielleicht in der Angabe, daß es sich um einen Bazillus von kokkiformer Gestalt handelt, der lipolytische Fähigkeiten aufweist.

Da beide Bakterien auch in naher Beziehung zu der Entstehung der Rotztuberkeln bei Olivenbäumen stehen, sollen an dieser Stelle auch die diesbezüglichen Untersuchungen, soweit erforderlich, Erwähnung finden. Eine im Jahre 1907 erschienene Arbeit PETRI versucht die bis dahin von ihm selbst und von verschiedenen anderen Forschern vorliegenden Ergebnisse über den Erreger der Rogna zusammenzufassen und gleichzeitig zu klären. Es ist sehr schwer, diese Verhältnisse zu durchleuchten, da die Forscher, wie es den Anschein hat und sie auch gegenseitig von sich behaupten, keine Reinkulturen von Bakterien vor sich hatten. PETRI gibt drei Arten von Bakterien an, die er unter dem Sammelnamen *Bacillus oleae* (Arc.) Trev. in ihren Kultureigenschaften aufführt.

Es handelt sich dabei um *Bacillus oleae* α (SMITH), um *Bacillus oleae* β und *Bacillus oleae* γ (BERLESE = *Bac. oleae tuberculosis* = *Ascobacterium luteum* BABES). Leider ist auch hier die Beschreibung der Eigenschaften so ungenau, daß sie keine sichere Diagnostik für den bedeutet, der dieselben Bakterien zu züchten hat. Lediglich der von SMITH isolierte und beschriebene *Bacillus oleae* α , den auch PETRI seinen Versuchen zufolge als den wirklichen Erreger der Rogna bezeichnet, ist in mehreren Kultureigenschaften angegeben.

Vergleicht man die von PETRI für diese drei Mikroorganismen in Tabellenform aufgeführten diagnostischen Merkmale, so kommt man zu der Ansicht, daß es sich bei *Bacillus oleae* γ , wahrscheinlich auch bei *Bacillus oleae* α nicht um Reinkulturen handeln kann. Wahrscheinlich hat PETRI, als er seine Untersuchungen über die Identität des Rotzbazillus durchführte, nicht mit einer Reinkultur von *Bacillus oleae* α = *Bacterium savastanoi*, sondern mit einer Mischkultur von α und γ gearbeitet. Dies ist um so eher zu vermuten, als er selbst bestrebt war, das Aussehen der Mischkolonien anzugeben, die aus den beiden Bakterien entstehen, wenn sie jeweils nach Wachstumsdauer, Alter und Üppigkeit verschieden sind. Er selbst meint, daß, entgegen seiner 1905 geäußerten Ansicht, „sogar die Gegenwart des Zentralkernes aus gekapselten Elementen an und für sich kein sicheres Urteil über die Reinheit der *Ascobacterium*-Kolonien gestattet (PETRI 1907, S. 536).

Ein Jahr nach PETRI veröffentlichte 1908 E. F. SMITH, drei Jahre nach seiner ersten Arbeit, seine „Recent Studies of the Olive-tubercle Organism“. Er bemühte sich mit Erfolg, die auf diesem Gebiete vorliegenden Untersuchungsergebnisse, deren erste von ARCANGELI bereits aus dem Jahre 1886 stammen, zu ordnen. Bei seinen Impfversuchen bestätigte er aufs neue seine Feststellungen aus dem Jahre 1905, daß der *Bacillus oleae* α SMITH als der eigentliche Erreger der Rogna anzusehen sei. Er gibt ihm die Bezeichnung *Bacterium savastanoi* und liefert eine eingehende Beschreibung dieses Mikroorganismus, die sich wiederum weitgehend mit dem äußeren Aussehen und der Größe der Kolonien

befaßt. Eine zweite Beschreibung gilt dem *Bacillus oleae* β dem SCHIFF-GIORGINISCHEN Mikroorganismus, die aber infolge ihrer Unvollständigkeit nicht zur Aufnahme in BERGEYS Manual führte. Obwohl SMITH schreibt: „During this study it was learned that a yellow schizomycete, perhaps more than one, quite frequently accompanies or follows the parasite“ (1908, S. 126), geht er auf diesen überhaupt nicht ein.

Soweit die Ergebnisse früherer Forscher. Die Ausführungen beweisen, daß sowohl im Falle der Rogna als auch der symbiontischen Bakterien der *Dacus oleae* keine letzte Klarheit erreicht werden konnte.

Das Material, das mir für meine Untersuchungen zur Verfügung stand, war leider nicht besonders umfangreich. Ein großer Teil der übersandten Larven der *Dacus oleae* hatte sich nicht nur schon verpuppt, sondern war bereits vorher ausgeschlüpft, ein anderer hatte schon die Bakterien aus den larvalen Blindsäcken ausgestoßen. Es handelte sich um Larven, Puppen und Imagines der Herbstgeneration. Es gelang mir in fast allen Fällen sowohl aus den Blindsäcken der Larven als auch aus den einzelnen Darmabschnitten der Larven und Imagines ebenso bei den Tönnchen ein Anwachsen der Bakterien auf dem Spezialnährboden zu erzielen. Die Kolonien auf festen Nährböden sowie das mikroskopische Ausstrichpräparat deuten darauf hin, daß es sich auf Grund der verschiedenen Länge der Bakterien um Mischkulturen von mindestens zwei Bakterien handeln könne. Grampositive Stäbchen traten in einigen Fällen auf. Die auf Agar-Agar ausgestrichenen, zuerst farblosen Kolonien nahmen zum Teil jeweils nach einigen Tagen bei stärkerem Wachstum eine gelbe Farbe an, andere blieben mehr weiß, wobei die einzelnen Angaben PETRIS bezüglich der Farbveränderung bei Mischkulturen von *Pseudomonas savastanoi* und *Ascobacterium luteum* von farblos über strohgelb zu lichtgelb beobachtet werden konnten. Vermutlich handelt es sich um Mischkulturen dieser beiden Mikroorganismen. Die Isolierung bereitete große Schwierigkeiten und ergab zunächst einzelne Kulturen, die auf Agar gelb gewachsen waren und deren Prüfung auf Lackmusmilch nach angemessener Zeit zur Peptonisation führte. Zum anderen lieferten sie farblose bis lichtgelbe Kolonien, die erst nach wochenlangem Stehen die Lackmusmilch peptonisierten, während sie schon in kurzer Zeit eine alkalische Reaktion zeigten. Die rein farblosen Kolonien dagegen ließen die Lackmusmilch alkalisch werden. Ein wesentlicher Unterschied im Ausstrichpräparat zeigte sich nicht. Nitrat wurde nicht reduziert, Gelatine nicht verflüssigt. [Die Methode nach CLARK (1955) war mir zu diesem Zeitpunkt noch nicht bekannt.] Auch ergaben die farblosen bzw. üblich als weiß bezeichneten Kolonien keine Abscheidung eines grünen, fluoreszierenden, wasserlöslichen Pigmentes in den Nährboden, eine Eigenschaft, die zwar von SMITH und PETRI selbst nicht erwähnt, in der letzten Beschreibung in

BERGEYS Manual 1948 nach BROWN (1932) jedoch für den von PETRI vermuteten Symbionten angegeben wird. Auf Grund dieser nicht beschriebenen Eigenschaft wurde das *Bacterium savastanoi* SMITH in der 1. Auflage von BERGEYS Manual 1923 als *Phytomonas savastanoi* und nicht als *Pseudomonas savastanoi* aufgeführt.

Obwohl die Eigenschaften eines Teiles der so erhaltenen Kulturen für das *Bacterium savastanoi* übereinstimmen, erschien mir doch auf Grund dieses grünfluoreszierenden Pigmentes das wirkliche Vorliegen dieses Bakteriums gegeben. Denn es wäre sonst durchaus möglich, daß es sich nicht um den gesuchten Symbionten, sondern um einen ähnlichen Begleitkeim handeln würde. Nach alledem mußte man an das Vorhandensein von Mischkulturen denken, die sich vorläufig, trotz aller Bemühungen, nicht vollkommen trennen ließen. Auch die Eigenschaften des gleichzeitig mit ihm zusammen wachsenden, an sich oft kokkiform erscheinenden zweiten Bakteriums decken sich fast vollständig mit denen der *Pseudomonas*, wie sie von PETRI für das *Ascobacterium* angegeben sind. Die Bildung von Kapseln konnte nicht beobachtet werden, da diese sich nur unter ungünstigen Lebensbedingungen ausbilden. PETRI (1905, S. 399) aber verzichtet in seiner ausführlichen Arbeit über diesen Mikroorganismus auf eine weitere Angabe von Eigenschaften, „da die Charaktere dieser Kolonien eine ganz sichere diagnostische Note darstellen“, eine Behauptung, die er, wie bereits erwähnt, 1907 nicht mehr aufrechterhält. Vielmehr ist er dann der Ansicht, daß „das Fehlen jeglichen Antagonismus zwischen den beiden Bakterien sehr leicht eine Verschmelzung der noch ganz kleinen, dem bloßen Auge unsichtbaren Kolonien zu einer einzigen Kolonie bewirkt“ (PETRI 1907, S. 535).

Da die durchgeführten Isolierungsversuche zunächst keine befriedigenden Ergebnisse zeitigten und die Annahme, es müsse sich immer noch um Mischkolonien handeln, wahrscheinlich nicht ungerechtfertigt war, außerdem die anfallende Arbeit eine weitere eingehende Bearbeitung nicht gestattete, wurden die isolierten Kulturen auf Stichagar verbracht und, um sie zu erhalten, mehrere Male überimpft.

Als ich nun nach etwa einem $\frac{3}{4}$ Jahr zur Klärung der Verhältnisse diese Kulturen erneut auf Endoplaten ausstrich, stellte sich nach wenigen Tagen die Abscheidung eines grünen, wasserlöslichen Pigmentes ein. Gleichzeitig bestätigte sich die Vermutung, daß es sich immer noch um Mischkulturen handle, bei denen in einem Falle das fluoreszierende, im anderen Falle das nicht fluoreszierende Bakterium vorherrschend war. Das Isolieren gelang erst nach mehrmaligem Überimpfen vollständig, wurde jedoch dieses Mal durch das aufgetretene Pigment wesentlich erleichtert. Auch hier bestätigte sich so wiederum die Erfahrung, daß diese Pigmentbildung, wie bereits für *Pseudomonas mutabilis* erwähnt, nicht immer eintritt, und zwar fast nur unter Nahrungs-

mangel auf Primitivnährböden oder in Stichkulturen. Daraus läßt sich auch erklären, daß weder PETRI noch SMITH, die beide mit diesem Bakterium gearbeitet haben, dieses Pigment erwähnen. Die endgültige Isolierung ergab nun zwei, bereits auch nach dem Ausstrichpräparat verschiedene Bakterien. Im ersten Falle handelt es sich um gram-negative Kurzstäbchen von etwa $0,5\text{--}0,75\ \mu$ Dicke und $1,4\text{--}3,5\ \mu$ Länge. Letztere kann sich auf verschiedenem Nährsubstrat etwas verändern. Meistens treten sie nach dem Färben nicht klar heraus, sondern scheiden schleimige Stoffe aus und sind untereinander verkettet. Diese Beobachtung deckt sich mit den Angaben PETRI'S (1910, S. 359), daß „die Bakterien in der Imago 24—48 Std nach der Geburt eine durchsichtige schleimige Substanz darstellen, die untereinander verkettete Anhäufungen bilden.“

Das zweite Bakterium stellt sich nach dem Ausstrichpräparat meist als kokkiform dar ($0,5\text{--}0,8\ \mu$ dick und $1,0\text{--}1,6\ \mu$ lang), doch ergeben Veränderungen des Nährbodens auch eine mögliche Verlängerung zu sehr kurzen und dicken Stäbchen. Die genaue Überprüfung der Kultureigenschaften beider Bakterien lieferte folgende Ergebnisse, die in Tabelle 4 aufgeführt sind.

Aus dieser Tabelle läßt sich entnehmen, daß es sich bei der Reinkultur von Bakterium 1 tatsächlich um *Pseudomonas savastanoi* SMITH = *Bacterium savastanoi* SMITH = *Phytomonas savastanoi* SMITH handelt, da es in allen angeführten Kultureigenschaften mit ihm übereinstimmt. Somit ist die bloße Vermutung PETRI'S durch die direkte Anzucht des Symbionten aus *Dacus oleae* bestätigt.

Bei Bakterium 2 müßte es sich um das *Ascobacterium luteum* handeln, soweit sich dies auf Grund der angegebenen tatsächlich spezifischen Merkmale sagen läßt. Vergleichen wir nun die genauen Daten der beiden Bakterien mit den Beschreibungen von PETRI für den *Bacillus oleae* α , β und γ aus den Rotztuberkeln, so wird man wohl zu dem Schluß kommen müssen, daß es sich bei seinem *Bacillus oleae* γ = *Ascobacterium* nicht um eine Reinkultur, sondern um eine Mischkultur von *Pseudomonas savastanoi* und *Ascobacterium luteum* gehandelt hat. Daraufhin deutet die Angabe über zuerst weiße, fast farblose Kolonien, die langsame Gelatineverflüssigung, das Unverändertbleiben der Lackmusmilch und die Beweglichkeit, Beobachtungen, die ich an den Mischkulturen ebenfalls machte. Es spricht alles dafür, daß es sich um eine Mischkultur gehandelt hat, bei der das *Ascobacterium* nicht in größerer Menge beteiligt war, so daß seine Eigenschaften, wenigstens soweit sie von PETRI beschrieben sind, sich an und für sich mit denen der *Pseudomonas savastanoi* decken.

Zunächst aber läßt sich zusammenfassend feststellen: Es ist mir gelungen, den von PETRI vermuteten Symbionten aus den Larven,

Tabelle 4

	<i>Bacterium 1</i> = <i>Pseudomonas savastanoi</i>	<i>Bacterium 2</i> = <i>Ascobacterium luteum</i>
Färbung	gramnegativ	gramnegativ
Größe	0,5—0,75 × 1,4—3,5 } Kurzstäbchen	0,5—0,8 × 1,0—1,6 } kokkiform
Beweglichkeit . . .	1—4 Polargeißeln lebhaft beweglich	keine Polargeißeln unbeweglich
Koloniebildung auf Agar	flach, feucht glänzend, durchscheinend, grünfluo- reszierendes, wasser- lösliches Pigment	flach-kugelig, feucht glänzend, milchig weiß
Dextrose-Bouillon . .	keine Haut	keine Haut
Dextrose-Gärröhrchen	Bildung von Säure ohne Gas, aerob	keine Säurebildung, aerob
Laktose-Gärröhrchen	keine Säurebildung, aerob	keine Säurebildung, aerob
Temperaturoptimum	20° C	20° C
Indolbildung	—	—
H ₂ S-Produktion . .	—	+
Nitratreduktion . .	—	—
Lackmuskmilch . . .	alkalisch	peptonisiert (nach langer Zeit)
Gelatineverdauung .	—	+
Stärkeabbau	+	—
Harnstoffangriff . .	+	—
Kapselbildung	—	+ (selten zu beobachten)
Verwertung von	pH-Wert	pH-Wert.
Glukose 7,7	7,4	7,8
Laktose 7,7	7,8	7,75
Maltose 7,6	7,8	7,75
Saccharose . . . 7,6	7,4	7,85
Raffinose 7,7	7,7	7,7

Puppen und Imagines von *Dacus oleae* zu züchten, ebenso das meist mit ihm zusammen im Darm vorkommende *Ascobacterium*. Für das letztere war bis jetzt infolge der fehlenden genauen Daten eine Einordnung nach dem Bestimmungsschlüssel von BERGEY nicht möglich. Deshalb ist es lediglich ohne Beschreibung seiner Kultureigenschaften im Anhang aufgeführt. Die im Jahre 1896 von BABES und auch noch von PETRI vorgenommene Zuordnung zur Gattung *Ascobacterium* wegen

des Auftretens von gekapselten Elementen ist heute nicht mehr vertretbar. Auf Grund seiner Eigenschaften dürfte der vorliegende Mikroorganismus zur Familie Rhizobiaceae gehören. Die Familie umfaßt drei Gattungen, von denen *Rhizobium* sich auf Leguminosen findet, die zweite, *Chromobacterium*, ein violettes Pigment erzeugt, während die dritte Gattung *Agrobacterium* als pflanzenpathogen an Wurzeln vorkommt, beziehungsweise Hypertrophien an den Zweigen hervorruft, ohne freien Luftstickstoff zu fixieren.

Da die wenigen zur Gattung *Agrobacterium* gehörenden Arten, die fast alle zuerst als *Phytomonas* oder *Pseudomonas* beschrieben wurden, fast ausnahmslos Kapselbildung zeigen und auch die sonstigen Eigenschaften nicht sehr stark von denen des *Ascobacterium* abweichen, vor allem Kohlenhydrate nicht unter Säurebildung abgebaut werden, ist es wahrscheinlich, daß das *Ascobacterium luteum* zu dieser Gattung gehört. Ich möchte es deshalb als *Agrobacterium luteum* bezeichnen.

Nicht ganz von der Hand zu weisen ist schließlich sogar die Vermutung, daß nicht *Pseudomonas savastanoi*, sondern das *Agrobacterium* die Rotztuberkeln hervorruft. Um dies nachzuweisen, wären allerdings ausgedehnte Impfversuche an Olivenbäumen notwendig. Ich bin gerne bereit, die gezüchteten Reinkulturen dieser beiden Bakterien für Impfversuche, die ich leider nicht selbst durchführen kann, zur Verfügung zu stellen.

PETRI gibt an, daß *Pseudomonas savastanoi* regelmäßig in *Dacus oleae* vorkommt, und so scheint es sicher, daß es sich bei diesem Mikroorganismus um den Symbionten handelt. Der tatsächliche Beweis ließe sich nur durch eine große Zahl von untersuchten Individuen erhärten oder durch die Kultivierung und Identifizierung der Bakterien vom abgelegten Ei. *Ascobacterium* = *Agrobacterium luteum* dagegen ist ein Begleitkeim, dessen Bedeutung für *Dacus oleae* zunächst noch ungeklärt ist. Auch lassen sich diese Ergebnisse nicht auf die ganze Subfamilie ausdehnen, da für die Untersuchungen nur *Dacus oleae* GMELIN zur Verfügung stand.

3. Begleitkeime

Wie schon in den vorangegangenen Abschnitten erwähnt, wurden in vielen Fällen neben dem eigentlichen Symbionten Begleitkeime gezüchtet. Dabei handelte es sich 1. um grampositive Stäbchen, 2. um grampositive Kokken, 3. um gramnegative Elemente von mehr oder weniger großer Länge. Die grampositiven Bakterien sind in der Minderzahl, und die Häufigkeit ihres Auftretens liegt bei Larven durchschnittlich zwischen 5 und 10% (entsprechend bei Puppen und steril geschlüpften Imagines), bei den gekescherten und nicht steril geschlüpften Fliegen zwischen 10 und 20%. Bei den isolierten grampositiven Kokken

handelt es sich in der Regel um *Staphylococcus aureus* oder ihm sehr nahe stehende Arten. Die grampositiven langen Stäbchen — kurze grampositive Stäbchen ließen sich niemals züchten — waren Angehörige der *Subtilis*-Gruppe.

Diese treten auch mit großer Regelmäßigkeit in den Blütenköpfen der Kompositen auf, so daß sie, wie bereits ausgeführt, auf dem Wege der Nahrungsaufnahme in den Darmkanal gelangen. Erstaunlich allerdings ist es, daß ihre Zahl neben den gramnegativen Bakterien äußerst gering ist, was die Annahme nahe legt, daß sie entweder durch Verdauung unschädlich gemacht oder in ihrer Vermehrung durch antibiotische Fähigkeiten der gramnegativen Flora gehemmt werden.

Bei den gramnegativen Elementen jedoch liegen die Verhältnisse sehr viel komplizierter. Denn die Zahl der Arten, die ich im Verlaufe meiner Untersuchungen als Begleitkeime des Symbionten isolieren mußte, war so hoch, daß es mir zeitlich unmöglich war, diese alle in ihren sämtlichen Eigenschaften zu erfassen. Zudem ist es bei den meisten nicht möglich, sie ihren Daten zufolge mittels des Bestimmungsschlüssels von BERGEY mit einer der beschriebenen Arten zu identifizieren. Um dennoch einen kurzen Ausschnitt aus der Fülle dieser Begleitkeime zu geben, führe ich in nachstehender Tabelle eine kleine Anzahl von ihnen auf. Ihre Bestimmung jedoch gelang meistens nicht, da nur wenige von ihnen beschrieben sind. So konnte nur für manche von ihnen eine Einordnung zu einer ihnen nahestehenden Art vorgenommen werden.

Hinweise auf die Bedeutung der Symbiose

Jede Symbiose wirft die Frage auf, welchen Vorteil der Wirt aus ihr zieht. Zur Diskussion dieser Frage, nicht zu ihrer Klärung, möchte ich von einigen Versuchen berichten, die ich im Rahmen der Arbeit durchführen konnte. So sollte durch Abwandlung des Nährbodens der Stoffwechsel der symbiontischen Bakterien und seine Auswirkungen auf das Wirtstier geklärt werden. Insgesamt wurde das Verhalten von *Pseudomonas mutabilis* (isoliert von den in verschiedenen Pflanzenteilen lebenden Trypetidenarten), von *Pseudomonas savastanoi* und *Agrobacterium luteum* geprüft. Zu diesem Zweck wurde ein synthetischer Grundnährboden folgender Zusammensetzung verwendet:

Aqua dest.	1000	(NH ₄) ₂ SO ₄	10
KH ₂ PO ₄	5	Na-Citrat	0,5
K ₂ HPO ₄	7	pH =	7,2
MgSO ₄	0,1		

Dieser Grundnährboden wurde durch Zugabe verschiedener Verbindungen entsprechend abgewandelt. So enthielten, wie aus Tabelle 6 ersichtlich, die Nährböden 1—5 überhaupt keine N₂-Quelle und sollten den Beweis erbringen, ob eine Assimilation von Luftstickstoff stattfindet. Um auch jeglichen Einfluß von NH₃ aus der Luft auszuschalten,

Tabelle 5. Begleitkeime

Begleitkeime aus	<i>Acidia cognata</i>	<i>Acidia cognata</i>	<i>Chaetostomella onohr.</i>	<i>Tephritis conura</i>
Übereinstimmend mit BERGEYS Artbeschreibung für		<i>Erwinia atroseptica</i>		<i>Klebsiella</i>
Färbung	gramnegativ	gramnegativ	gramnegativ	gramnegativ
Größe	Kurzstäbchen	Kurzstäbchen	Kurzstäbchen	Kurzstäbchen
Beweglichkeit. . .	lebhaft	lebhaft	unbeweglich	unbeweglich
Koloniebildung auf Agar	flach-kugelig, feucht glänzend, milchig weiß	flach-kugelig, feucht glänzend, milchig weiß	flach, grünlich-gelbes, nicht wasserlösliches Pigment mit Schwärznehmung	flach-kugelig, feucht glänzend, milchig weiß
Dextrosebouillon .	keine Haut	keine Haut	keine Haut	keine Haut
Dextrose-Gärrohrechen . .	keine Säure, aerob	Säure und Gas, aerob und anaerob	keine Säure, aerob	Säure und Gas, aerob und anaerob
Laktose-Gärrohrechen . .	keine Säure, aerob	Säure und Gas, aerob und anaerob	keine Säure, aerob	Säure und Gas, aerob und anaerob
Temperaturoptimum	20° C	20° C	20° C	20° C
Indolbildung	—	—	—	—
H ₂ S-Produktion. . .	+	—	—	—
Nitratreduktion . .	+	+	—	+
Lackmismilch . . .	peptonisiert	Koagulation mit Retraktion	peptonisiert, bläulich	unverändert
Gelatineverdauung	—	+	+	—
Stärkeabbau	—	+	kein Wachstum	+
Harnstoffangriff. .	+	+	kein Wachstum	+

Verwertung von	p _H -Wert		p _H -Wert		p _H -Wert	
Glukose . . .	7,7	7,8	7,05	kein Wachstum	6,7	
Laktose . . .	7,7	7,75	7,55	kein Wachstum	7,35	
Maltose . . .	7,6	7,9	7,35	kein Wachstum	7,3	
Saccharose . .	7,6	7,75	7,15	kein Wachstum	7,00	
Raffinose . . .	7,7	8,00	7,15	kein Wachstum	7,00 7,3	
Begleitkeime aus	<i>Tephritis dilac</i>		<i>Ictericia westerm.</i>		<i>Sphenella marg.</i>	
Übereinstimmend mit BERGEYS Artbeschreibung für	<i>Ervinia carnegiana</i>		<i>Ervinia</i>		<i>Esensia sonchi</i>	
Färbung	gramnegativ		gramnegativ		gramnegativ	
Größe	Kurzstäbchen		Kurzstäbchen		Kurzstäbchen	
Beweglichkeit . . .	lebhaft		lebhaft		lebhaft	
Koloniebildung auf Agar	flach-kugelig, durchscheinend, feucht glänzend		halbkugelig, durchscheinend, etwas schleimig		halbkugelig, undurchsichtig, matte Oberfläche, etwas schwärmend	
Dextrosebouillon .	keine Haut		keine Haut		keine Haut	
Dextrose-Gärröhrchen . .	Säure und Gas, aerob und anaerob		Säure, aerob		Säure, aerob und anaerob	
Laktose-Gärröhrchen . .	Säure und Gas, aerob und anaerob		Säure, aerob		Säure, aerob und anaerob	
					<i>Platyparca poec.</i>	
					<i>Escherichia freundii</i>	
					gramnegativ	
					Kurzstäbchen	
					lebhaft	
					halbkugelig, glänzend, milchig weiß	
					keine Haut	
					Säure, aerob und anaerob	
					Säure, aerob und anaerob	

Tabelle 5. (Fortsetzung)

	<i>Tephritis diloc</i> <i>Ervinia carnegeiana</i>	<i>Icteric westerm.</i> <i>Ervinia</i>	<i>Sphenella marg.</i>	<i>Ensina sonchi</i> <i>Escherichia</i>	<i>Platyparia poec.</i> <i>Escherichia freundii</i>
Begleitkeime aus Übereinstimmend mit BERGEYS Arbeschreibung für					
Temperaturoptimum	20° C	20° C	20° C	20° C	20° C
Indolbildung . . .	—	—	—	—	+
H ₂ S-Produktion . .	+	+	—	+	+
Nitratreduktion . .	+	+	—	+	+
Lackmuspilch . .	Koagulation mit Retraktion	Reduktion	Reduktion	unverändert	unverändert
Gelatineverdauung	+	—	—	—	—
Stärkeabbau . . .	—	—	—	+	—
Harnstoffangriff . .	+	+	+	+	+
Verwertung von	p _H -Wert	p _H -Wert	p _H -Wert	p _H -Wert	p _H -Wert
Glukose . . . 7,7	7,4	7,4	7,85	6,15	6,15
Laktose . . . 7,7	7,05	7,55	7,8	7,8	7,9
Maltose . . . 7,6	7,7	7,25	7,9	7,9	7,9
Saccharose . . 7,6	7,5	7,25	7,9	7,95	7,95
Raffinose . . 7,75	7,35	7,7	7,8	7,85	7,85

wurden Kontrollversuche durchgeführt, indem durch Erhitzen die NH_3 -Reste aus den Röhrchen ausgetrieben wurden. Anschließend wurden sie in einen Exsiccator über konz. H_2SO_4 vor und nach dem Beimpfen verbracht. Der Zusatz von Bernsteinsäure (4) und Oxalessigester (5) sollte eine Angleichung an die in den Tieren gegebenen physiologischen Bedingungen schaffen. (Die sonst dafür verwendete Oxalessigsäure stand mir nicht zur Verfügung.)

Die Nährböden 6, 7 und 8 enthielten außerdem als einzige N_2 -Quelle $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Durch die Nährböden 9, 10 und 11 sollte der Abbau von Eiweißverbindungen, die in der Nahrung der Larven in großer Menge vorhanden sind, geprüft werden, mittels der Nährböden 12 und 13 der Abbau von Harnstoff und Harnsäure.

Die Ergebnisse der Tabelle 6 zeigen zunächst, daß sich die Symbionten, obwohl es sich um das gleiche Bakterium handelt, an die Ernährung des Wirtstieres angepaßt haben: 1. Das Wachstum von *Pseudomonas mutabilis* aus *Ceratitis capitata* ist auch noch auf Nährboden 1 ohne Zusatz von $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ besser als das der übrigen. Denn die Ernährung durch den Fruchtsaft bringt besonders große Mengen Glukose in den Darmtrakt. 2. Aus demselben Grunde zeigt *Pseudomonas mutabilis* aus der Spargelfliege (*Platyparea poeciloptera*) auf dem raffinosehaltigen Nährboden (3) ohne Zusatz von Stickstoff ein besseres Wachstum. 3. Der Abbau von Leucin als N_2 -Quelle ist besonders gut bei *Pseudomonas mutabilis* aus den in Infloreszenzen lebenden Trypetidenarten und aus *Platyparea poeciloptera*, da die Blütenköpfe der Kompositen und die Spargelstengel nach der Feststellung mittels Papierchromatogramm das Leucin in sehr reichlichen Mengen enthalten. Der Abbau bzw. Wiederaufbau jedoch erfolgt nicht über NH_3 . 4. Dies trifft auch für Prolin zu, das ebenso auffallend gut von *Pseudomonas mutabilis* aus *Ceratitis capitata* als N_2 -Quelle verwertet wird, da es in größerer Quantität in Orangen enthalten ist.

Weiterhin zeigt sich, daß *Pseudomonas mutabilis* und *Pseudomonas savastanoi* auf N_2 -freien Nährböden nur schlecht zu wachsen vermögen. Wird jedoch dem stickstofffreien Nährboden (4) Bernsteinsäure zugesetzt, so tritt eine Steigerung des Wachstums ein. Auch diese Tatsache mag dafür sprechen, daß *Pseudomonas mutabilis* der Symbiont ist, da das *Agrobacterium* diese Fähigkeiten nicht besitzt. Erstaunlich jedoch ist, daß bei Zugabe von $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ zu Bernsteinsäure (7) das Wachstum zunächst vollständig gehemmt und diese Hemmung erst nach 8—10 Tagen von den Bakterien überwunden wird, auch von *Agrobacterium luteum*.

Oxalessigester ohne Zusatz von $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (5) wird nicht verwertet und erzeugt kein Anwachsen, während unter Beigabe von $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (8) ein normales Wachstum möglich ist. Oxalessigester wird dabei nicht angegriffen, wirkt aber auch nicht wachstumshemmend.

Tabelle 6

Nr.	Zusammensetzung des Nährbodens	<i>Pseudomonas miltabilis</i>					<i>Pseudomonas sarastanoi</i>	<i>Agrobacterium luteum</i>
		<i>Tephritis arctica</i>	<i>Rhagoletis alternata</i>	<i>Ceratitis capitata</i>	<i>Acidia cognata</i>	<i>Platyparea pocloptera</i>		
1	1,0 Glukose ohne N ₂	+	—	++	+	—	—	—
2	1,0 Laktose ohne N ₂	+	+	+	+	+	—	—
3	1,0 Raffinose ohne N ₂	+	+	—	—	—	—	—
4	1,0 Laktose ohne N ₂ 0,1 Bernsteinsäure	+	++	++	++	+	+	—
5	1,0 Laktose ohne N ₂ 0,1 Oxalessigester	—	—	—	—	—	—	—
6	1,0 Laktose mit N ₂	+++	++	++	++	+	+	—
7	1,0 Laktose mit N ₂ 0,1 Bernsteinsäure	anfangs — nach 8–10 Tagen ++	—	—	—	—	—	—
8	1,0 Laktose mit N ₂ 0,1 Oxalessigester	++	++	++	++	+	+	+
9	1,0 Glukose ohne N ₂ 0,1 Asparaginsäure	++	++	++	++	+	+	+
10	1,0 Glukose ohne N ₂ 0,1 Leucin	++	++	++	++	+	+	+
11	1,0 Glukose ohne N ₂ 0,1 Prolin	++	++	++	++	+	+	+
12	1,0 Glukose ohne N ₂ 0,1 Harnstoff	++	++	++	++	+	+	+
13	1,0 Glukose ohne N ₂ 0,1 Harnsäure	++	++	++	++	+	+	+

Zeichenerklärung: Wachstum + — sehr gering; + gering; ++ mäßig; +++ sehr gut.

NH₃-Bildung: + normal; ++ befriedigend; +++ gut.

NH₃-Bildung: + normal; ++ befriedigend; +++ gut.

Auf Nährböden mit Zusatz von Harnstoff (12) und Harnsäure (13) als einzigen Stickstoffquellen erfolgte schon nach wenigen Stunden eine sichtbare Trübung, und das Wachstum war stärker als auf den anderen Nährböden. Nur das *Agrobacterium* vermag Harnstoff nicht abzubauen, wohl aber Harnsäure. Die Prüfung mit NESSLERS Reagens zeigte, daß in den Nährböden NH_3 entstanden ist.

In allen Fällen wurde nun auf papierchromatographischem Wege versucht, einen Aufbau von Eiweißstoffen festzustellen, weil diese Methode in ihrer Verbesserung auch den Nachweis geringster Mengen von Aminosäuren gestattet. Da sich in den Chromatogrammen kein Auftreten von Aminosäuren zeigt, dürfte es ausgeschlossen sein, daß die Symbionten in der Lage sind, freien Luftstickstoff zu assimilieren. Nur in den mit Harnsäure und Harnstoff versetzten Nährböden (12 und 13) bildeten sich neue Aminosäuren. Ein Kontrollversuch schloß die Verunreinigung der verwendeten Substanzen aus. Es liegt deshalb die Vermutung nahe, daß der Symbiont Fermente besitzt, die Harnstoff und Harnsäure spalten können. Bei den aufgebauten Aminosäuren handelt es sich um Asparaginsäure und Leucin.

Da Harnstoff, vor allem aber Harnsäure, in den MALPIGHISCHEN Gefäßen der Insekten gebildet und am Übergang in den Enddarm angereichert werden, ist es denkbar, daß die Symbionten diese beiden Verbindungen verwerten und durch den Aufbau von Aminosäuren mittels eines Ektoenzym die in der Nahrung knappen Eiweißstoffe vermehren. Auch das *Agrobacterium* hätte sich demnach auf den Abbau von Harnsäure umgestellt. Interessant wäre es allerdings, ob auch das aus den Tuberkeln gezüchtete *Agrobacterium* dieses Vermögen besitzt.

Ob die Bakterien im Darm der Larven und Imagines selbst verdaut werden und damit zur Bereicherung der Eiweißnahrung beitragen ist nicht bekannt. PETRI (1910, S. 362) schreibt: „Aus meinen Untersuchungen geht hervor, daß eine Verdauung der Bakterienzellen in den Blindschläuchen niemals stattfindet. In dieser Hinsicht bin ich jedoch etwas im Zweifel, betreffs der Bakterienzellen, welche als übermäßiges Produkt ihrer Vermehrung fortwährend durch die Blindschläuche ausgeschieden werden.“ Nach dieser Annahme würden die Symbionten selbst als ständige Eiweißquelle dienen, was jedoch wohl schwer nachzuweisen ist.

Ziel weiterer Untersuchungen mag sein, ob die Bakterien darüber hinaus Wirkstoffe der Vitamin B-Gruppe und ähnliche Substanzen für ihre Wirte liefern.

Allerdings scheint, wie schon erwähnt, *Pseudomonas mutabilis* die Fähigkeit zu besitzen, auf Grund ihrer antibiotischen Eigenschaften grampositive Stäbchen und Kokken in ihrer Vermehrung sehr stark zurückzudrängen. Nach der Menge der vorkommenden grampositiven

Bakterien auf Blütenköpfen und Blättern ist es erstaunlich, daß nur wenige grampositive Keime sich gelegentlich im Darmtrakt finden, obwohl sie doch unbedingt mit der Nahrung aufgenommen werden müssen. Diese Tatsache bestätigte sich auch immer wieder bei der Anzucht der Bakterien. PETRI machte die Beobachtung, daß bei *Dacus-Imagines*, deren Schlunddrüse infolge der verspäteten Entwicklung der *Pseudomonas savastanoi* leer ist, häufig Infektionen durch Bakterien oder Pilze auftreten. Damit dürfte den symbiontischen Bakterien neben ihrer möglichen Aufgabe als Wirkstoff- und Eiweißlieferanten auch die wichtige Tätigkeit der Infektionsverhütung durch ihre starken antibiontischen Fähigkeiten zufallen.

Anzufügen ist noch, daß PETRI dem *Ascobacterium luteum* eine gewisse lipolytische Wirkung zuschreibt, die für die Larven der *Dacus* bestimmt von großem Wert ist. Ich selbst habe diese Versuche wiederholt, und es zeigte sich tatsächlich, daß allein von dem als *Agrobacterium* bezeichneten Bakterium eine Klärung der ölhaltigen Kulturflüssigkeit (Nährboden nach PETRI) einsetzte, die nach 12—14 Tagen abgeschlossen war. Auch damit mag bewiesen sein, daß dieses *Agrobacterium* mit dem *Ascobacterium* identisch ist.

In diesem Zusammenhang soll auch noch eine weitere interessante Beobachtung an *Pseudomonas mutabilis* und *Pseudomonas savastanoi* beschrieben werden. Wie bereits erwähnt, ist die leuchtendrote Farbe, die die Kolonien beider auf der Endoplatte zeigen, sehr auffällig. Für die Diagnostik bedeutet die Rotfärbung, daß der betreffende Keim in der Lage ist, die im Nährboden enthaltene Lactose abzubauen, so daß Aldehyd frei wird. Der auftretende Acetaldehyd bewirkt die Rotfärbung der beigefügten Fuchsinlösung, die durch Zusatz von NaHSO_3 entfärbt worden war. Nun fiel auf, daß weder *Pseudomonas mutabilis* noch *Pseudomonas savastanoi* die Lactose unter Säurebildung abbauen.

Um diese Verhältnisse zu kontrollieren, wurden Endoplatten hergestellt, die neben fuchsin-schwefliger Säure keine Lactose enthielten. Außerdem wurden zur weiteren Prüfung 1. ein Nährboden folgender Zusammensetzung verwendet: Aqua dest. 1000, Pepton 10, konz. alkoholische Fuchsinlösung 25, NaHSO_3 -Lösung 10% und 2. zu gewöhnlicher Bouillon ohne Kohlenhydrate fuchsin-schweflige Säure zugesetzt (wie bei 1).

Die Ergebnisse bestätigten die vorliegenden Erfahrungen. Alle roten Modifikationen der *Pseudomonas mutabilis* und der *Pseudomonas savastanoi* liefern auf diesen Endoplatten leuchtendrote Kolonien, die weißen Modifikationen der *Pseudomonas mutabilis* spalten auf. Auch auf den flüssigen Nährböden mit Peptonwasser entstehen rote Ringe, bzw. die gesamte Kulturflüssigkeit färbt sich rötlich. Lediglich auf gewöhnlicher Bouillon war in keinem Falle eine rote Farbstoffeinlagerung

zu beobachten. Vielleicht mag dies mit dem p_H -Wert des Nährbodens zusammenhängen. Somit scheint bewiesen, daß von diesen beiden Bakterien Eiweißstoffe so abgebaut werden, daß aldehydartige Substanzen entstehen. Ob dabei der Abbau über Azetaldehyd erfolgt, welche Zwischenstufen auftreten, kann nur durch langwierige Untersuchungen zum Stoffwechselgeschehen geklärt werden. Vielleicht aber ließe sich daraus ableiten, daß die Symbionten die mit der Nahrung der Wirtstiere aufgenommenen Eiweißstoffe verwerten und sie in anderer Zusammensetzung diesen wiederum zukommen lassen. Auch diese Vermutungen bedürften eingehender Untersuchungen. Interessant ist jedenfalls, daß es sich bei den Symbionten um Bakterien handelt, die einen besonderen Stoffwechsel haben, also sehr stark fermentaktiv sind, was auch die Peptonisation der Lackmusmilch beweist.

Zusammenfassung

1. Aus den Larven, Puppen und Imagines der in verschiedenen Pflanzen und Pflanzenteilen lebenden Trypetidenarten der Subfamilien Trypetinen und Tephritinen konnte immer das gleiche Bakterium gezüchtet werden.

2. Die Anzucht dieses Bakteriums war nur unter Verwendung eines äußerst empfindlichen und hochwertigen Spezialnährbodens möglich, der den physiologischen Bedingungen weitgehend angeglichen ist, die dem Symbionten im Darm der Tiere geboten werden.

3. Das gezüchtete Bakterium wurde seinem Verhalten zufolge in die Gattung *Pseudomonas*, Familie Pseudomonadaceae, eingereiht. Da die Art nicht beschrieben ist, wurde das Bakterium auf Grund seiner hervorstechendsten Eigenschaft als *Pseudomonas mutabilis* n. sp. bezeichnet.

4. Eingehende Untersuchungen ergaben, daß *Pseudomonas mutabilis* der Symbiont ist. Dafür sprechen

a) die außerordentlich große Regelmäßigkeit, mit der dieses Bakterium aus den Larven und steril geschlüpften Imagines, besonders aber auch aus den Symbiontenorganen der Tribus Tephritini kultiviert werden konnte.

b) die Kultivierung dieses Bakteriums aus den in sterilem Medium abgelegten Eier von *Platyparea poeciloptera* und *Rhagoletis alternata*.

c) der positive Ausfall des Agglutinationstestes,

d) die Unmöglichkeit den Symbionten aus dem Milieu der Larven zu züchten.

5. Es gelang, den von PETRI vermuteten Symbionten von *Dacus oleae* (Subfamilie Dacinae), das *Bacterium savastanoi* SMITH aus den Larven, Puppen und Imagines zu kultivieren. Die Überprüfung seiner Kultureigenschaften ergab seine Identität mit der aus den Rotztuberkeln der Olivenbäume isolierten *Pseudomonas savastanoi*.

6. Der Begleitkeim der *Pseudomonas savastanoi* aus *Dacus oleae*, das *Ascobacterium luteum*, wurde ebenfalls isoliert und erstmals in seinen sämtlichen Kultureigenschaften bestimmt.

7. Auf Grund dieser Eigenschaften wurde das *Ascobacterium* in die Familie Rhizobiaceae zur Gattung *Agrobacterium* gestellt und als *Agrobacterium luteum* bezeichnet.

8. Als Begleitkeime von *Pseudomonas mutabilis* wurden grampositive Stäbchen, grampositive Kokken und gramnegative Stäbchen festgestellt. Ein Teil dieser Keime konnte in das System eingeordnet werden.

9. Versuche zum Stoffwechselgeschehen der symbiontischen Bakterien ergaben, daß sie sich weitgehend den Verhältnissen in den Wirtstieren angepaßt haben.

10. Sie weisen ferner darauf hin, daß die Bedeutung der Symbionten im Umbau von Harnsäure und Harnstoff liegen könnte, da in solchen Nährböden ein Neuaufbau von Eiweißstoffen festzustellen ist.

11. Besonders auf grampositive Begleitkeime üben die Symbionten eine kräftige antibiotische Hemmwirkung aus, so daß diese in ihrer Vermehrung sehr stark geschädigt werden.

12. Schließlich besitzen *Pseudomonas mutabilis* und *Pseudomonas savastanoi* die Fähigkeit, Eiweißverbindungen über aldehydartige Substanzen abzubauen.

Literatur

- BERGEY'S Manual of Determinative Bacteriology, 6. Aufl. Baltimore: Willians & Wilkins Company 1948. — BERLESE, A.: Gravi alterazioni batteriche dell'Olivio. Riv. Pat. veg. I Orig. **58** (1905). — BROWN, N.: Canker of ash trees produced by a variety of the olive-tubercle organism *Bacterium savastanoi*. J. Agricult. Res. **44**, 701 (1932). — BUCHNER, P.: Endosymbiose der Tiere mit pflanzlichen Mikroorganismen. Basel u. Stuttgart: Birkhäuser 1953. — GLASGOW, H.: The gastric caeca and the caecal bacteria of the heteroptera. Biol. Bull. **26** (1914). — HENDEL, FR.: Trypetidae. Stuttgart: E. Schweizerbart 1927. — KELLNER, W., u. H. HELLMUTH: Untersuchungen zum Aminosäurestoffwechsel von *Bacterium coli*. Z. Hyg. **141**, 1 (1955). — KELLNER, W., H. HELLMUTH u. H. MARTIN: Verbesserung des Nachweises geringster Aminosäuremengen. Naturwiss. **41** (1954). — MELIS, A.: Asservazioni Anatomo-Morfologiche sulle larve del *Dacus oleae* Rossi e del *Bibio HORTULANUS* L. Riv. Biol. **10** (1928). — PETRI, L.: Sopra la particolare localizzazione di una colonia batterica nel tubo digerente della larva della *mosca olearia*. Atti Accad. Lincei (5), Cl. Sci. fis., mat. e nat. **13** (1904). — Weitere vorliegende Mitteilung. Atti Accad. Lincei, Rend. **14** (1905). — Untersuchungen über die Identität des Rotzbazillus des Ölbaumes. Zbl. Bakter. **19**, 531 (1907). — Untersuchungen über die Darmbakterien der Olivenfliege. Zbl. Bakter. II **26**, 357 (1910). — Aus: Ricerche sopra i batteri intestinali della *mosca olearia*. Mem. Staz. Pat. veg., Roma **1909**. — PHILLIPS, E.: The anterior peristigmatic glands in Trypetid larvae. Dep. Ent., Cornell University, Ithaca, New York. — SAVASTANO, L.: Tubercolosi, iperplasie e tumori nell'Olivio. I. u. II. Memoria Napoli 1887. — SCHIFF-GIORGINI, R.: Bakteriologische Untersuchung über *Bacillus oleae* (Arc.) Trev. Zbl. Bakter. II **12**, 217 (1904). — Untersuchungen über die Tuberkelkrankheit

des Ölbaumes. Zbl. Bakter. **15**, 200 (1905). — SMITH, E. F.: Some observations on the biology of the olive tubercle-organism. Zbl. Bakter. II **15**, 198 (1905). — Recent studies of the olive tubercle-organism. Dep. Agric. Pl. Ind. Bull. **126** (1908). — STAMMER, H. J.: Die Bakteriensymbiose der Trypetiden (Diptera). Z. Morph. u. Ökol. Tiere **15**, 481 (1929). — Die Verbreitung der Endosymbiose bei den Insekten. Overgedrukt Tijdschr. Entom. Dell. **55** (1952). — STEINHAUS, E. A.: Insect Microbiology. Ithaka: Comstock Publishing Co. 1946. — TOTH, L.: Die Rolle der Mikroorganismen in dem N₂-Stoffwechsel der Insekten. Zool. Anz. **146**, 191 (1951). — VIRTANEN, A.: Biological nitrogen fixation. Biochemic. J. **33** (1939). — WIGGLESWORTH, V.: The principles of insect physiology, 3. Aufl. London: Methuan & Co. **1947**.

H. HELLMUTH, Nürnberg, Hallerstr. 23/II

Lebenslauf

Am 4. März 1927 wurde ich in Regensburg als Tochter des Studienrates Friedrich Hellmuth und seiner Ehefrau Wally geboren. Von 1933 bis 1937 besuchte ich die Volksschule in Weiden Opf. und anschließend bis 1945 das dortige humanistische Gymnasium. Im Sommersemester 1946 begann ich das Studium an der Universität Würzburg, das ich mit der wissenschaftlichen Prüfung für das Höhere Lehramt im Herbst 1950 abschloß. Das Seminarjahr leistete ich an der Oberrealschule Würzburg ab, an der ich im Juli 1951 die Pädagogische Prüfung ablegte.

Im Sommer 1954 immatrikulierte ich wieder an der Universität Erlangen mit dem Ziel der Promotion.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten: Schleip, Penners, Wohlfahrt, Burgeff, Zeidler, Gößwald, Jessen, Kraus, Gerling, Ackermann, Emmert, Schlenk, Fischer, Skraup, Bennewitz, Kuhlenskampff, Wellstein, Stammer, Schwemmle.

